

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Januar 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/04508 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/47

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07705

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. Juli 2001 (05.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 33 080.0 7. Juli 2000 (07.07.2000) DE
101 19 294.0 19. April 2001 (19.04.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, 55216 Ingelheim am Rhein (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHWEIFER, Norbert [AT/AT]; Herzmanskystrasse 20/2/5, A-1140 Wien (AT). SCHERL-MOSTAGEER, Marwa [AT/AT]; Glockengasse 21/1/4, A-1020 Wien (AT). SOMMERGRUBER, Wolfgang [AT/AT]; Linzerstrasse 19, Haus 4, A-3002 Purkersdorf (AT). ABSEHER, Roger [AT/AT]; Schlossgasse 15/16, A-1050 Wien (AT).

(74) Anwälte: LAUDIEN, Dieter; c/o Boehringer Ingelheim GmbH, 55216 Ingelheim am Rhein usw. (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): CA, JP, MX, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

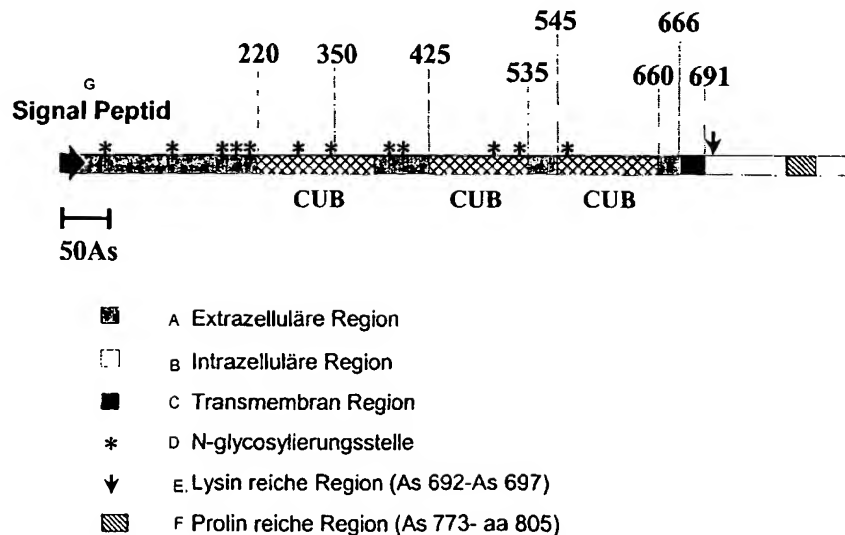
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: TUMOUR-ASSOCIATED ANTIGEN (B345), CHARACTERISED BY AN AMINO ACID SEQUENCE AS IN SEQ. ID. NO. 4

(54) Bezeichnung: TUMORASSOZIIERTES ANTIGEN (B345), GEKENNZEICHNET DURCH EINE AMINOSÄURESEQUENZ WIE IN SEQ. ID. NO. 4



A...EXTRACELLULAR REGION
B...INTRACELLULAR REGION
C...TRANSMEMBRANE REGION
G...SIGNAL PEPTIDE
D...N-GLYCOSYLATION SITE
E...LYSINE-RICH REGION (As 692-As 697)
F...PROLINE-RICH REGION (As 773-aa 805)

(57) Abstract: The invention relates to the tumour-associated antigen B345 and to DNA molecules which code for the same.

(57) Zusammenfassung: Tumorassoziiertes Antigen B345 und dafür kodierende DNA-Moleküle.

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/04508 A1



— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

TUMORASSOZIIERTES ANTIGEN (B345), GEKENNZEICHNET DURCH EINE AMINOSAURESEQUENZ
WIE IN SEQ. ID. NO.4

- 5 Die Erfindung bezieht sich auf die Chemotherapie von Tumorerkrankungen.

Normale Körperzellen unterliegen einem strikt geordneten System, das das Wachstum, die Zellteilung und das Absterben bestimmter Zellen kontrolliert. So teilen sich
10 Körperzellen einer erwachsenen Person nur dann, wenn sie tote Zellen ersetzen oder eine Verletzung verheilen müssen. Krebszellen dagegen wachsen unkontrolliert weiter, sie akkumulieren und bilden einen Tumor. Erreicht der Tumor eine kritische Größe, können
15 Krebszellen über die Blutbahnen oder das Lymphsystem auch in andere Bereiche des Körpers transportiert werden und dort Kolonien bilden (Metastasen). Nicht alle Tumore sind kanzerogen, denn benigne Tumore metastasieren nicht und sind daher meistens nicht lebensgefährlich, da sie
20 chirurgisch entfernt werden können. Detailliertere Informationen zu diesem Thema sowie den weiter unten diskutierten Aspekten der Tumorentstehung geben folgende Publikationen: Rauscher und Vogt, 1997; Kastan, 1997; Hesketh, 1995; Pusztai, Lewis und Yap, 1995.

- 25 Die Transformation einer gesunden Zelle in eine Krebszelle kann durch eine ganze Reihe von Faktoren, wie Umwelteinflüsse, Strahlung, Viren oder chemische Reagenzien ausgelöst werden. Bei der Tumorentwicklung spielen jedoch auch epigenetische (Methylierungen,

Acetylierungen und veränderte Chromatinstruktur) und genetische Modifikationen (Punktmutation, Deletion, Amplifikation, Translokation) eine bedeutende Rolle.

5 Mutationen in kodierenden Bereichen von Genen, die an der Regulation der Zell-Proliferation beteiligt sind, können an der Überführung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle beitragen, da die transformierte Zelle Wachstumsvorteile gegenüber ihrer gesunden Nachbarzelle hat.

10 Krebs entsteht also durch eine Ansammlung von vererbten oder erworbenen Mutationen in kritischen Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen.

Die Zellproliferation steht unter der Kontrolle verschiedener Gensysteme, während Produkte von Onkogenen
15 an der Signalvermittlung von Zelloberfläche zum Zellkern beteiligt sind, geleiten cyclinabhängige Proteinkinase und ihre Inhibitoren die Zelle durch den Zellzyklus. Nicht selten werden Störungen in der Synthese dieser Proteine bei Tumorzellen gefunden. Eine zentrale Rolle
20 spielt dabei das p53-Protein.

Proteine vom Typ des RB-Proteins regulieren die Verfügbarkeit entscheidender Transkriptionsfaktoren.

Die in Tumorgeweben hochregulierten Gene stellen meist den Ausgangspunkt für weitere detaillierte Analysen dar
25 und da Proteine verschiedenster Funktionen hochexprimiert werden, ist der Ansatz für therapeutische Interventionen sehr vielseitig. Es ist daher das Ziel der Krebsforschung weitere neue Zielmoleküle (sog. „Targets“) für therapeutische Interventionen zu finden,

die dann für eine gezielte Therapie mit geringen Nebenwirkungen benutzt werden können.

In erster Linie gilt es daher molekulare Veränderungen zwischen Normalgewebe und Tumor auf dem Niveau der Genexpression („Transkriptionslevel“) aufzudecken, die einerseits neue Targets identifizieren sollen und andererseits für die Entwicklung bzw. das Auffinden von Substanzen zur Hemmung von Fehlfunktionen herangezogen werden können.

- 10 Eine ganze Reihe verschiedenster Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von neuen Targets, die den Ausgangspunkt für die Entwicklung von neuen Therapeutika darstellen, basieren auf der Erstellung differenzieller mRNA Transkriptionsprofile zwischen
- 15 Tumoren und Normalgeweben. Dazu zählen die differenzielle Hybridisierung, die Erstellung von Subtraktions-cDNA-Banken ("representational difference analysis"; Hubank und Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) und der Einsatz der DNA-Chip Technologie oder der
- 20 SAGE-Methode (Velculescu et al., 1995).

- Neben immuntherapeutischen Ansätzen kommt der gezielten Chemotherapie eine wesentliche Rolle bei der Behandlung von Krebs zu. Unter Chemotherapie versteht man die Verabreichung von Substanzen, die durch Eingriff in
- 25 Stoffwechsel, Signaltransduktion und Zellteilungsvorgänge maligner Zellen entweder zytostatisch oder zytotoxisch-zytolytisch wirken. Chemotherapeutika lassen sich auf Grund der Beeinflussung von spezifischen Targets in der
- 30 Tumorzelle, nach Art der zellulären Interaktion und der

Wechselwirkung mit einer bestimmten Zellzyklusphase, in verschiedene Kategorien unterteilen.

Die Art der Krebsbehandlung hängt vom Tumorstadium ab, entscheidend ist dabei, ob bereits Metastasen vorhanden
5 sind und wie weit diese im Körper verbreitet sind. Die Applikation von Zellgiften zur Krebsbehandlung ist, neben operativen Maßnahmen und der Strahlentherapie, ein integraler Bestandteil der heutigen Therapiekonzepte in der Onkologie.

10 Im wesentlichen gibt es zwei Hauptziele der Chemotherapie: In erster Linie ist es die Heilung von Krebs; das bedeutet, dass der Tumor verschwindet und nicht mehr auftritt. Ist eine Heilung aus verschiedensten Gründen nicht mehr möglich, versucht man
15 den Tumor in seinem Wachstum und seiner Ausbreitung einzuschränken bzw. zu kontrollieren.

Prinzipiell entfalten Substanzen, die bei der Chemotherapie Anwendung finden, ihre Wirkung bei allen sich teilenden Zellen. Tumorzellen zeigen jedoch eine
20 höhere Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika als gesunde Zellen, da hauptsächlich stark proliferierende Zellen angegriffen werden.

Jedes Gewebe hat ein charakteristisches Wachstumsverhalten, das Zellteilung, Wachstumsstillstand,
25 Differenzierung und Alterung umfasst und durch interne und externe Faktoren beeinflusst und reguliert wird.

Viele der heute eingesetzten zytotoxischen Chemotherapeutika wirken nur bei proliferierenden Zellen (nicht in der G₀-Phase der Zellteilung). Dabei werden

allerdings sowohl Normal- als auch Krebszellen
angegriffen. Die Zerstörung von normalen Zellen kann zu
starken Nebeneffekten führen; z.B. Zerstörung der
Blutzellen-produzierenden Gewebe des Knochenmarks
5 (Myelosuppression).

Chemotherapeutika werden je nachdem, wie sie spezifische
Substanzen innerhalb der Tumorzelle beeinflussen, mit
welchen zellulären Prozessen die Medikamente
interagieren und welche Zellzyklusphase sie
10 beeinflussen, in verschiedene Kategorien unterteilt.
Diese Informationen sind für Onkologen notwendig für die
Entscheidung welche Präparate bei der Therapie
miteinander kombiniert werden können.

Die in Tumorgeweben hochregulierten Gene stellen somit
15 potentielle neue Zielstrukturen dar und da Proteine
verschiedenster Funktionen hochexprimiert werden, ist
der Ansatz für therapeutische Interventionen sehr
vielseitig.

Es ist daher das Ziel der Krebsforschung, weitere neue
20 Targets für therapeutische Interventionen zu finden, die
dann für eine gezielte Therapie mit - verglichen mit
derzeitig eingesetzten Therapeutika - geringeren
Nebenwirkungen benutzt werden können.

In Tumorgeweben hochregulierte Gene stellen
25 Angriffspunkte und somit potentielle Zielstrukturen
 („Targets“) für die Chemotherapie dar.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein neues,
bevorzugt von Tumorzellen exprimiertes Protein
bereitzustellen, das ein Zielmolekül für die

Intervention mittels chemotherapeutischer Methoden darstellt.

Diese Aufgabe wurde gelöst, indem zunächst mittels RDA („representational difference analysis“) zwischen einer
5 Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie (A549) und
Normallungengewebe eine cDNA-Substraktionsbibliothek
hergestellt wurde. Zur Selektion der im Tumor
überexprimierten Antigene wurden anschließend die
erhaltenen cDNA-Klone sequenziert und mit in Datenbanken
10 verfügbaren Sequenzen verglichen. Unter den dabei
annotierten Genen befanden sich 321 unbekannte, zu denen
größtenteils ESTs ("expressed sequence tags") -Einträge
in der Datenbank existierten. Nach einer weiteren
qualitativen PCR-Analyse in cDNA-Bibliotheken von
15 kritischen Normalgeweben und immunprivilegierten Geweben
sowie detaillierteren Datenbankrecherchen wurde die
Anzahl der Kandidatenklone auf 59 eingeschränkt, deren
ESTs nicht aus kritischen Normalgeweben stammen.

Diese Klone wurden auf Incyte DNA Chips gespottet und
20 mit einer ganzen Reihe von Tumorgeweben und
Normalgeweben als Referenz hybridisiert. Das mRNA
Expressionsprofil von EST Fragmenten, die in
Krebsgeweben und Normalgeweben differentiell exprimiert
werden und zu einem noch unbekannten Gen gehören, wurde
25 mit unterschiedlichen Methoden verifiziert.

Die Länge der Transkripte wurde mittels Northern blot
Analyse bestimmt und das Expressionsmuster in
verschiedenen Zellsystemen durch quantitative PCR exakt
charakterisiert. Nur unbekannte Gene bzw. ESTs mit
30 tumorspezifischen Expressionsprofil wurden

weiterverfolgt und einer "full length Klonierung"
unterworfen. Potentielle ORFs ("open reading frames")
werden in die entsprechende Aminosäuresequenz
umgewandelt und zur möglichen Funktionsvorhersage
5 mittels in silico Strategien analysiert.

Die humane B345-cDNA wurde kloniert, die in einem ersten
Klonierungsansatz erhaltene Sequenz ist in SEQ ID NO:1
dargestellt. Die Sequenzanalyse der in diesem Ansatz
klonierten humanen B345-cDNA zeigte einen durchgehenden
10 offenen Leserahmen von Position 215 bis Position 2461
(exklusive Stopcodon), der, auf Nukleotid- und
Proteinebene, in den bekannten Sequenzen der Datenbanken
keine Homologie oder Identität aufweist. Aus den aus
Northern Blot Experimenten gewonnenen Daten ist zu
15 schließen, dass das B345-Transkript eine Länge von ca.
6,5 kb hat. In einem ersten Ansatz wurde als klonierter
Bereich eine B345-cDNA mit 5897 bp (exklusive polyA-
Region), erhalten, wobei das Vorhandensein eines
Polyadenylationssignals und des PolyA-Tails am 3'-Ende
20 der Sequenz auf die Vollständigkeit der cDNA in diesem
Bereich hindeutete. Aufgrund der Tatsache, dass im
5'-Bereich der klonierten cDNA von Position 1 bis 214
kein durchgehender Leserahmen aufschien, wurde zunächst
angenommen, dass es sich bei dem ATG an Position 215,
25 die auch zu 75% einer Kozak Translationinitiationsstelle
(ACCATGT) (Kozak, 1987) entspricht, um das Startkodon
von B345 handelt.

In einem weiteren Klonierungsansatz wurden mittels einer
molekularbiologischen Standardmethode, und zwar mittels
30 sog. „Promotor Finder DNA Walking“, zusätzliche

Informationen über die weiter stromaufwärts liegende Sequenz von B345 gewonnen.

Somit wurde die in dem ersten Klonierungsversuch erhaltene B345-Sequenz (SEQ ID NO:1) in der 5`Region
5 erweitert. Der Transkriptionsstart konnte unter Anwendung der Primer Extension Analyse genau lokalisiert werden und liegt bei Position 201 (SEQ ID NO:3). Durch wiederholte Sequenzierungen auch in der 3`Region wurde, im Vergleich zur in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz,
10 eine zusätzliche Base an Position 2430 gefunden, die zu einer Leserasterverschiebung führt und somit das Stoppcodon von Position 2729 auf 2791 verschiebt. Die erhaltene cDNA (SEQ ID NO:3) besitzt einen offenen Leserahmen, der für ein potentiell Protein mit einer
15 Länge von 836 Aminosäuren (SEQ ID NO:4) kodiert. Die Translationsinitiationsstelle an Position 283 entspricht etwa zu 70% einer Kozak-Konsensussequenz.

Die Promotorregion 200bp upstream der mutmaßlichen Transkriptionsstartstelle enthält weder eine TATA noch
20 eine CCAAT box, jedoch eine eindeutige GC-box, welche eine Bindungsstelle des SP1 Proteins darstellt. Die Tatsache , dass der GC Gehalt in der 5`Region über 60% ist, deutet auf ein CpG Island hin (Bird, 1986).

Die resultierende primäre Aminosäuresequenz von B345 ist
25 in SEQ ID NO:4 gezeigt. Die Analyse des Hydrophilizitäts Plots der Aminosäuresequenz zeigt, dass das B345 Protein zwei charakteristische hydrophobe Domänen aufweist, die ein Signalpeptid und eine helikale Transmembrandomäne darstellen (Fig. 6). Diese polarisierte Struktur deutet

darauf hin, dass es sich bei B345 um ein integrales Membranprotein handelt.

Die extrazelluläre Domäne läßt auf die Existenz von definitiv einer, gegebenenfalls drei, CUB Domänen schließen. CUB Domänen kommen bei verschiedenen, meist während der Embryonalentwicklung regulierten Proteinen vor. Eine kürzlich erschienene Publikation (Gerstein et al., 2000) demonstriert, daß CUB Domänen enthaltende Proteine die am ausgeprägtesten differenziell regulierten Proteine in *C. elegans* sind. Da Gene, die eine Schlüsselrolle in der Embryonalentwicklung haben, entsprechende Funktionen, z.B. in der Zellteilung, der Zellproliferation oder Signalübertragung, in Krebs ausführen, kann angenommen werden, dass eine Überexpression von B345 in Zellen eine Veränderung in den Eigenschaften der Substratadhäsion oder der extrazellulären Matrix bewirkt. Das B345 Protein weist 12 potentielle N-Glycosylierungsstellen auf, die in der mutmaßlichen extrazellulären Domäne zu finden sind.

Aufgrund seiner Aminosäuresequenz ist anzunehmen, dass das B345-Protein eine β -Sheet Sekundärstruktur ausbildet, da sich CUB Domänen bekanntlich als β -Sandwich falten.

Die intrazelluläre Domäne (Bereich 691-836) weist keine signifikanten Homologien auf. Der gesamte C-Terminus zeigt jedoch eine Identität (82%) über 124 Aminosäuren mit einem EST (Acc No. AW063026) aus humanen Eierstockkrebs Zellen.

Ausgehend von den Funktionen anderer CUB Domänen enthaltender Proteine kann gefolgert werden, daß das

B345 Transmembranprotein in der Kommunikation, der Interaktion und/oder der Signaltransduktion mit extrazellulären Komponenten oder Liganden eine Rolle spielt. Ferner sind die Daten der Expressionsanalyse ein
5 starkes Indiz dafür, dass B345 beim metastatischen Prozess von Krebs, insbesondere Dickdarmkrebs, beteiligt ist.

Für die Aufklärung der physiologischen Funktion und der Rolle von B345 bei der Metastasierung sind folgende
10 Untersuchungsmethoden geeignet:

Zunächst werden Zelllinien, vorzugsweise humane Zelllinien identifiziert, z.B. mittels TaqMan PCR, die B345 nicht endogen exprimieren. Die Zellen werden mit einem Plasmid, das die B345-Sequenz enthält,
15 transfiziert und B345 exprimiert. Änderungen in der Morphologie und/oder dem Migrationsverhalten, das z.B. mittels Softagar Assay (Hamburger und Salmon, 1977) oder Migrationsassay (Liaw et al; 1995) der B345 exprimierenden Zellen gegenüber den nicht-transfizierten
20 Zellen deuten auf eine Rolle von B345 in dem dafür verantwortlichen biologischen Prozess hin. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine Beteiligung von B345 an der Interaktion von Tumorzellen untereinander und/oder mit der extrazellulären Matrix und somit auf eine Funktion
25 bei der Metastasierung.

Alternativ bzw. zusätzlich zu dieser Funktionsanalyse wird in einem komplementären Ansatz die Expression von B345 in Zellen, die dieses Protein endogen exprimieren, unterdrückt, um ebenfalls die etwaige Änderungen in
30 Morphologie und/oder Migrationsverhalten festzustellen.

Außerdem wird gegebenenfalls untersucht, ob Proteinkomponenten existieren, die mit B345 inter- oder extrazellulär interagieren (z.B. mittels Yeast Two Hybrid System (Fields und Song, 1989)).

- 5 Die Erfindung betrifft somit in einem ersten Aspekt ein tumorspezifisches Polypeptid mit der Bezeichnung B345, mit der in SEQ ID NO: 4 angegebenen Aminosäuresequenz oder ein Polypeptid, das von einem Polynukleotid kodiert wird, das unter stringenten Bedingungen mit einem
- 10 Polynukleotid der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz oder einer Teilsequenz davon hybridisiert, sowie davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein isoliertes DNA-Molekül, kodierend für das

15 tumorspezifische Polypeptid der Bezeichnung B345.

Bevorzugt ist das erfindungsgemäße DNA-Molekül ein Polynukleotid der in SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz oder ein Fragment davon oder ein DNA-Molekül, das mit einem DNA-Molekül der in SEQ ID NO: 3 dargestellten

20 Sequenz oder einer Teilsequenz davon unter stringenten Bedingungen hybridisiert, oder ein Fragment davon.

Unter „stringenten Bedingungen“ wird z.B. verstanden: Inkubation über Nacht bei 65°C - 68°C mit 6xSSC (1xSSC = 150 mM NaCl, 15 mM Tri-Natriumcitrat), 5xDenhardt's

25 Lösung, 0.2%SDS, 50 µg/ml Lachsspermien-DNA, daran anschließend Waschen zweimal 30 min mit 2xSSC, 0.1% SDS bei 65°C, einmal 30 min mit 0.2xSSC, 0.1% SDS bei 65°C und gegebenenfalls abschließendes Spülen mit 0.1xSSC, 0.1%SDS bei 65°C, oder äquivalente Bedingungen.

Die erfindungsgemäßen DNA Moleküle kodieren für (Poly)peptide der Bezeichnung B345 mit der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz bzw. für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide; damit sind

5 DNA Moleküle bzw. Fragmente mitumfasst, die durch die Degeneration des genetischen Codes Abweichungen von der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz aufweisen

In einer Ausführungsform der Erfindung betrifft die Erfindung ein isoliertes DNA-Molekül der in SEQ ID NO:3

10 dargestellten Sequenz oder ein Fragment davon, oder ein DNA-Molekül, das mit einem DNA-Molekül der in SEQ ID NO:3 dargestellten oder mit einer Teilsequenz davon hybridisiert, kodierend für das natürliche B345-Polypeptid bzw. für ein Fragment davon.

15 Die B345-DNA-Moleküle können in einer sog. DNA-Vakzine für die Immuntherapie von Tumoren verwendet werden.

Dabei können die B345-DNA-Moleküle der Erfindung, vorzugsweise in rekombinanter Form als Plasmide, direkt oder als Bestandteil eines rekombinanten Virus, oder

20 Bakteriums verabreicht werden. Prinzipiell kann jede gentherapeutische Methode für die Immuntherapie von Krebs auf Basis von DNA ("DNA-Vakzine") auf B345-DNA angewendet werden, und zwar sowohl *in vivo* als auch *ex vivo*.

25 Beispiele für die *in vivo* Verabreichung sind die direkte Injektion von "nackter" DNA, entweder intramuskulär oder mittels Gen-Pistole ("gene gun") von der sich gezeigt hat, daß sie zur Bildung von CTLs gegen Tumorantigene führt. Beispiele für rekombinante Organismen sind

30 Vaccinia Virus, Adenovirus oder *Listeria monocytogenes*

(eine Übersicht wurde von Coulie, 1997, gegeben).

Desweiteren können synthetische Träger für Nukleinsäuren, wie kationische Lipide, Mikrosphären, Mikrokügelchen oder Liposomen für die *in vivo*

5 Verabreichung von Nukleinsäure-Molekülen, kodierend für B345-Peptid verwendet werden. Verschiedene Hilfsstoffe, die die Immunantwort verstärken, können mitverabreicht werden, z.B. Zytokine, entweder in Form von Proteinen oder dafür kodierenden Plasmiden. Die Applikation kann
10 gegebenenfalls mit physikalischen Methoden, z.B. Elektroporation, kombiniert werden.

Ein Beispiel für die *ex vivo* Verabreichung ist die Transfektion dendritischer Zellen, wie von Tuting, 1997, beschrieben, oder anderer APCs, die als zelluläre
15 Krebsvakzine zur Anwendung kommen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt die Verwendung von Zellen, die B345 exprimieren, entweder von sich aus oder, in
gegebenenfalls modifizierter Form, nach Transfektion mit
20 der entsprechend kodierenden Sequenz, für die Herstellung einer Krebsvakzine.

Alternativ zur natürlichen B345-cDNA bzw. Fragmenten davon können modifizierte Derivate verwendet werden. Diese umfassen Sequenzen mit Modifikationen, die für ein
25 Protein(fragment) bzw. Peptide mit stärkerer Immunogenität kodieren, wobei für die Modifikationen auf DNA-Ebene dieselben Überlegungen gelten wie für die oben beschriebenen Peptide. Eine weitere Art der Modifikation ist die Aneinanderreihung zahlreicher Sequenzen,
30 kodierend für immunologisch relevante Peptide, nach Art

einer Perlenschnur ("string-of-beads"; Toes et al., 1997). Die Sequenzen können auch durch Anfügung von Hilfselementen modifiziert werden, z.B. Funktionen, die eine effizientere Abgabe und Prozessierung des

5 Immunogens gewährleisten (Wu et al., 1995).
Beispielsweise kann durch Anfügen einer Lokalisierungssequenz in das endoplasmatische Retikulum ("ER targeting sequence") die Prozessierung und damit die Präsentation und letztlich die Immunogenität des

10 Antigens erhöht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein rekombinantes DNA-Molekül, das B345-DNA enthält, z.B. verbunden mit einer regulatorischen DNA-Sequenz, insbesondere einer heterologen

15 regulatorischen DNA-Sequenz, z.B. einem Promoter oder Enhancer.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt Antikörper gegen B345 bzw. Fragmente davon. Polyklonale Antikörper können in herkömmlicher Weise durch

20 Immunisierung von Tieren, insbesondere Kaninchen, mittels Injektion des B 345-Antigens bzw. Fragmenten davon, und anschließender Reinigung des Immunglobulins erhalten werden.

Monoklonale anti-B345-Antikörper können nach

25 Standardprotokollen gemäß dem von Köhler und Milstein, 1975, beschriebenen Prinzip gewonnen werden, indem Tiere, insbesondere Mäuse, immunisiert, anschließend antikörperproduzierende Zellen der immunisierten Tiere immortalisiert werden, z.B. durch Fusion mit

30 Myelomzellen, und der Überstand der erhaltenen Hybridome

mittels immunologischer Standard-Assays auf monoklonale anti-B345-Antikörper gescreent wird. Für den therapeutischen oder diagnostischen Einsatz im Menschen können diese tierischen Antikörper gegebenenfalls auf
5 herkömmliche Weise chimerisiert (Neuberger et al., 1984; Boulianne et al., 1984) oder humanisiert (Riechmann et al., 1988; Graziano et al., 1995) werden.

Humane monoklonale anti-B345-Antikörper(fragmente) können auch von sog. "Phage Display Libraries" (Winter
10 et al., 1994; Griffiths et al., 1994; Kruif et al., 1995; Mc Guinness et al., 1996) und mittels transgener Tiere (Brüggemann et al., 1996; Jakobovits et al., 1995) gewonnen werden.

Die erfindungsgemäßen anti-B345-Antikörper können in
15 immunhistochemischen Analysen für diagnostische Zwecke eingesetzt werden, oder als Therapeutikum in der Krebstherapie. (Ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung eines monoklonalen Antikörpers in der Krebstherapie ist Herceptin; ein Antikörper gegen das
20 Proto-Onkogen HER2. Herceptin kann in Brustkrebs-Patienten angewendet werden, die eine Überexpression von HER2 aufweisen.)

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung von B345-spezifischen Antikörpern, um
25 beliebige Substanzen selektiv zu bzw. in einen Tumor zu bringen, der B345 exprimiert. Beispiele für solche Substanzen sind zytotoxische Agenzien oder radioaktive Nuklide, deren Wirkung darin besteht, den Tumor Vorort zu schädigen. Aufgrund der relativ tumorspezifischen
30 Expression von B345 sind dabei nur geringe

Nebenwirkungen zu erwarten. In einem weiteren Aspekt können mit Hilfe von B345-Antikörpern Substanzen zur Sichtbarmachung von Tumoren, die B345 exprimieren, herangezogen werden. Dies ist für die Diagnose und die
5 Bewertung des Therapieverlaufs von Nutzen.

Therapeutische und diagnostische Anwendungen von Antikörpern, die für anti-B345-Antikörper in Frage kommen, sind in der WO 95/33771 beschrieben.

Das Protein der Bezeichnung B345 gemäß der vorliegenden
10 Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente, Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z. B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren.
15 Vorzugsweise werden sie für die Therapie von B345-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Lungen- und Kolonkarzinom.

B345 bzw. Peptide, Peptid-Äquivalente und Peptidomimetika können für die Immuntherapie von Krebs
20 eingesetzt werden, wie z.B. in der WO 00/73438 beschrieben, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird.

Es ist bekannt, dass tumorassoziierte Antigene tumorspezifische Mutationen aufweisen können, die zu
25 einer immunologischen Unterscheidung zwischen Tumor und Normalgewebe beitragen (Mandrizzato et al., 1997; Hogan et al., 1998; Gaudi et al., 1999; Wölfel et al., 1994). Um das Vorhandensein tumorspezifischer B345-Mutationen festzustellen, wird, zweckmäßig mit Hilfe von Sonden aus
30 der erfindungsgemäßen isolierten cDNA, die B345-cDNA aus

einem oder mehreren unterschiedlichen Tumoren kloniert und die erhaltenen Sequenzen mit Normalgewebs-B345-cDNA verglichen. Es werden Versuche durchgeführt, die zeigen sollen, ob Tumor-B345-Peptide aus einem gegenüber

5 Normalgewebs-B345 mutierten Sequenzabschnitt im Vergleich zu Normalgewebs-B345-Peptiden aus dem entsprechenden Abschnitt eine verstärkte Immunogenität aufweisen. Um zu bestätigen, dass etwaige Mutationen tumorspezifisch sind, können Antikörper gegen diese

10 Bereiche generiert und Tumorzellen auf Expression von möglichen Mutationen untersucht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt B345-Peptide, abgeleitet von Bereichen eines tumorexprimierten B345, die tumorspezifische

15 Mutationen aufweisen.

Auf Grund der bevorzugten Expression von B345 in Tumorzellen kann angenommen werden, dass dieses Protein eine wichtige Funktion für den Tumor hat, z.B. für Entstehung, Infiltration und Wachstum und somit ein

20 Target für die chemotherapeutische Intervention darstellt.

Im Hinblick auf seinen Einsatz als Target in der gezielten Chemotherapie wird B345 näher charakterisiert, um die geeignete Strategie für die Intervention mit

25 dieser Funktion zu entwickeln.

Als ersten Schritt bei der sog. "down-stream" Funktionsanalyse von B345 führt man zweckmäßig in einem ersten Schritt eine bioinformatische Analyse durch, die den für die experimentelle Validierung von B345 als

30 Target richtungweisend ist.

Für diese Analyse stellen die auf Ähnlichkeit und modularer Struktur beruhenden Bioinformatik-Konzepte eine wesentliche Grundlage dar. Etablierte bioinformatische Hilfsmittel zur Feststellung von

5 Ähnlichkeiten sind BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, Altschul et al., 1997) oder FASTA (Pearson & Lipman, 1988), die spezialisierten Datenbanken wie Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Pfam>, Bateman et al., 2000) und

10 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>, Schultz et al., 2000), welche Domänenstrukturen berücksichtigen. Zur Verfeinerung der Analyse können Applikationen wie Clustal (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>, Higgins et al., 1996) HMMer (<http://hmm.wustl.edu>), PSI-BLAST

15 (Altschul et al., 1997) und die PROSITE Datenbank (<http://www.expasy.ch/prosite>, Hofmann et al., 1999) herangezogen werden. Statistische Analysemethoden, die nicht auf Homologien beruhen, gestatten die Vorhersage weiterer struktur- und funktionsrelevanter Eigenschaften

20 wie der Sekundärstruktur und des Auftretens von Transmembransegmenten und Helix-Turn-Helix-Motiven. Methoden zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen sind verfügbar; besonders erwähnenswert ist Jpred (<http://barton.ebi.ac.uk/servers/jpred.html>, Cuff

25 et al., 1998). Die Sekundärstrukturvorhersage kann Funktionshypothesen untermauern, etwa wenn die Struktur des vermuteten Homologen bekannt ist.

Gemäß Bioinformatikanalyse weist B345 eine helikale Transmembrandomäne auf, wobei sowohl der N-terminale als

30 auch der C-terminale Bereich hydrophil sind, was darauf schließen lässt, dass dieses Protein ein Transmembranprotein darstellt. Der N-terminale,

extrazelluläre Bereich besitzt einige CUB-Domänen, welche zu Disulfidbrückenbildung neigen und daher bei der Dimerisierung bzw. bei Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt sind (Bork et al., 1993). Das
5 C-terminale, intrazelluläre Ende zeigt Homologien zu einer Rezeptorkinase und zu einem C-Kinase Substrat.

In weiterer Folge wird B345 einer biochemischen und biologischen Analyse unterworfen.

In einem nächsten Schritt wird die Funktion von B345 für
10 das Tumorgeschehen aufgeklärt; z.B. durch Proliferationsassays in vitro oder in Tiermodellen, die das zu untersuchende B345-Gen überexprimieren (konstitutiv oder induzierbar) und als Kontrolle entweder in deletierter (inaktiver) Form exprimieren
15 oder über Antisense hinunterregulieren (siehe z.B. Grosveld und Kollias, 1992).

B345 kann in Screening-Assays verwendet werden, um Substanzen zu identifizieren, die die Aktivität dieses Proteins modulieren, insbesondere inhibieren. In einer
20 Ausführungsform kann ein derartiger Assay z. B. darin bestehen, das B345 Protein, oder ein aktives Fragment davon, in Zellen, die auf die Aktivität von B345 mit Proliferation reagieren, einzubringen bzw. die entsprechende B345 cDNA in der Zelle zur Expression zu
25 bringen, und die Proliferation der Zellen in Gegenwart und in Abwesenheit einer Testsubstanz zu bestimmen.

Ein Beispiel für Testzellen sind Zellen mit niedriger Teilungsrate, z.B. primäre Zellen, die kein endogenes B345 aufweisen. Um die Eignung der Zellen für einen
30 Screening-Assay festzustellen, werden diese mit

- B345-cDNA transformiert, gezüchtet und mit Standard-Assays, z.B. Thymidin-Einbau, auf ihre Proliferationsfähigkeit getestet. Aufgrund einer nach B345-Expression signifikanten Erhöhung ihrer
- 5 Proliferationsfähigkeit können sie als Testzellen eingesetzt werden, z.B. in High Throughput Screening Proliferationsassays. Beispiele für Proliferationsassays im High Throughput Format, z.B. auf Grundlage des MTS-Assays, sind in der WO 98/00713 beschrieben.
- 10 Substanzen mit proliferationshemmender Wirkung können zur Behandlung von Tumoren mit starker B345-Expression verwendet werden, insbesondere beim Lungen- und Kolonkarzinom.
- 15 Figurenübersicht:
- Fig. 1A: Expressionsprofil von B345, B452 und B540 in individuellen Lungenkarzinomen und Lungentumorzelllinien.
- Fig. 1B: Expressionsprofil von B345 in normalem
- 20 Dickdarmgewebe und Tumorzelllinien.
- Fig. 1C: Graphische Darstellung des Alignments von B345, B452 und B540.
- Fig. 2A: Northern Blot Analyse der Tumorzelllinie A549 mit einem 490bp langem B345 PCR-Produkt
- 25 Fig. 2B: Northern Blot Analyse verschiedener Normalgewebe mit einem 490bp langem B345 PCR-Produkt

Fig. 2C: Northern Blot Analyse verschiedener
Krebsgewebe mit einem 318bp langen B345
PCR-Produkt

5 Fig. 3 mRNA Expressionsanalyse von B345 durch
real-time PCR von Tumor- und Normal-Geweben.

Fig. 4: mRNA Expressionsanalyse von B345 durch
real-time PCR von Laser-Mikroskop-präparierten
Dickdarmtumoren (LCM) sowie normalem
Dickdarmgewebe und Tumorzelllinien.

10 Fig. 5: Graphische Darstellung der Genstruktur von
B345.

Fig. 6: Hydrophilizitäts-und Transmembran-Blot des
B345-Proteins

Fig. 7: Potentielle Proteinstruktur von B345

15

Tabellenübersicht

20 Tab. 1: Zusammenfassung der Northern Blot Daten von
B345 in verschiedenen Normalgeweben (1A),
Krebszelllinien (1B); und verschiedenen
Normalgeweben im Vergleich mit dem
entsprechenden Tumorgewebe (1C)

25 Tab. 2A: Zusammenfassung der Daten der quantitativen
PCR von B345 in verschiedenen Normal- und
Krebsgeweben

Tab. 2B: Zusammenfassung der Daten der quantitativen
PCR von B345 in verschiedenen Normalgeweben
und mikrodisssektierten Kolonadenokarzinom
Geweben

5

Zeichenerklärung

	+++	extrem positiv
	++	stark positiv
	+	positiv
10	(+)	schwach positiv
	-	negativ

Beispiel 1

15 RDA („Representational Difference Analysis“) von der
humanen Adenokarzinom-Zelllinie der Lunge (A549) und
normalem Lungengewebe

Die von ATCC bezogene humane Lungenadenokarzinom-
Zelllinie A549 (CCL 185) wurde in T150 Zellkulturflaschen
hochgezüchtet. Als Nährmedium diente MEM mit 10% hitze-
20 inaktiviertem, fötalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin.
Alle 3 bis 4 Tage wurden die Zellen durch Trypsinisieren
1:5 bis 1:10 zur Propagation gespalten. Nach Erreichen
von etwa 80% Konfluenz wurden pro T150 Zellkulturflasche
4 ml einer Trypsinlösung (Angaben pro Liter: 8g NaCl,
25 0,2g KCl, 1,13g Na₂HPO₄-wasserfrei, 0,2g KH₂PO₄,
100ml 2,5% Trypsinlösung, 1g EDTA-Na-Salz; pH 7,2 - 7,4)

zum Ernten der Zellen eingesetzt. Die 4 ml wurden in ein 15 ml Falconröhrchen transferiert, mit 8 ml PBS versetzt, bei 1200 rpm in einer Haereus Tischzentrifuge (Megafuge 2.0R) 5 min bei 4°C zentrifugiert, das

5 Zellpellet mit 1 ml Lysis-Puffer (10mM Tris-HCl pH8, 140mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5% NP40) versetzt, kräftig geschüttelt und in einem 2 ml Eppendorfgefäß bei 12 000 rpm und 4°C 5 min in einer Sigma Tischzentrifuge (Sigma 202 MK) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in

10 ein neues Eppendorfgefäß transferiert und nach Zusatz von 55 µl 20% SDS-Lösung zweimal mit dem doppelten Volumen an einer CHCl₃/Phenol (1:1 v/v) Mischung und einmal mit dem einfachen Volumen an CHCl₃ extrahiert. Die wässrige RNA-enhaltende Phase wurde mit 1/10 Volumen an

15 3M NaAc (pH5) und dem zweifachen Volumen an 96% EtOH versetzt und über Nacht bei -20°C die RNA präzipitiert. Ausgehend von 1 mg Gesamt-RNA wurde für die Isolierung von poly-A(+)RNA mittels des PolyATtract Kit (Promega) entsprechend dem Hersteller-Protokoll vorgegangen. Die

20 Lagerung der A549 poly-A(+)RNA mit einer Konzentration von 1 mg/ml in DEPC-behandeltem H₂O erfolgte in Aliquots bei -80°C.

Zur Durchführung der repräsentativen Differenzanalyse (RDA; Hubank and Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996)

25 wurde die poly-A(+)RNA der Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 als „tester“, die von normalem Lungengewebe (1 mg/ml; Clontech, Palo Alto; #6524-1) als „driver“ eingesetzt. Die RDA wurde unter Verwendung des PCR-select™ kit (Clontech, Palo Alto) entsprechend dem

30 Hersteller-Protokoll durchgeführt, mit der Ausnahme, dass ein modifiziertes Primer/Adaptor-2-Oligonukleotidsystem zum Einsatz kam: Adaptor-2-alt-1

- (SEQ ID NO:31) und nested-PCR-primer-2-alt (SEQ ID NO: 32) und Adaptor-2-alt-2 (SEQ ID NO: 33). Die neu generierten Primer/Adaptor-Sequenzen ermöglichen durch die Anwesenheit von drei neuen
- 5 Restriktionsenzymststellen (Kpn I, Sac I und Xho I) in der Sequenz des nested-PCR-primer-2-alt nach Klonierung der subtrahierten cDNA-Fragmente in den pPCRII-Vektor ein nachträgliches Herausschneiden der jeweiligen cDNA-Fragmente. Das Designen einer
- 10 Primer/Adaptorsequenz mit mehreren verfügbaren Restriktionsenzymststellen war deshalb notwendig, weil besonders in den Primersequenzen - bedingt durch die PCR-Amplifikationsschritte- oft Punktmutationen zu beobachten waren.
- 15 Nach der Synthese von doppelsträngiger cDNA mittels oligo-dT wurde die erhaltene cDNA von "tester" und "driver" mit *RsaI* verdaut (*RsaI* ist ein 4-Basen erkennendes Restriktionsenzym und liefert im statistischen Mittel 256 bp lange cDNA-Fragmente).
- 20 Gleiche Teile von "tester-cDNA" wurden entweder mit den Adaptoren 1 oder 2 ligiert und anschließend getrennt mit einem Überschuss an "driver-cDNA" bei 65°C hybridisiert. Danach wurden die beiden Ansätze vereinigt und einer zweiten Hybridisierung mit frischer denaturierter
- 25 "driver-cDNA" unterworfen. Die angereicherten "tester"-spezifischen cDNAs wurden anschließend durch PCR, mit für die Adaptoren 1 bzw. 2 spezifischen Primern, exponentiell amplifiziert. Für eine weitere Anreicherung wurde ein Aliquot dieser Reaktion einer zweiten PCR mit
- 30 spezifischen nach innen versetzten ("nested") Primern unterworfen. Die aus dieser Reaktion resultierenden, exponentiell amplifizierten cDNA-Fragmente wurden direkt

in den pCRII-Vektor (Invitrogen; "TA-cloning vector") ligiert und anschließend ein Drittel des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli* (OneShot™, Invitrogen) transfiziert.

- 5 712 positive Transformanten (Blau-Weiß-Selektion) wurden erhalten und in 96-Napf Blöcken in LB-Amp Medium (1,3 ml pro Napf) für 48 h bei 37°C kultiviert. Pro Napf wurden 750 µl der *E. coli* Suspensionen für die Präparation der Plasmid-DNA eingesetzt (96-Napf- Minipräparationsmethode
10 von QIAGEN nach Vorschrift des Herstellers). Die verbleibenden Bakterienkulturen wurden als Glycerinstammkulturen bei -80°C gelagert.

- Es wurde eine aus 712 Einzelklonen bestehende cDNA-Subtraktionsbibliothek erhalten, die sowohl in Form von
15 *E. coli* Glycerin-Stammkulturen als auch in Form gereinigter Plasmide vorlag.

Beispiel 2

DNA-Sequenzierung und Annotation von TAA-Kandidaten

- 20 Die isolierte Plasmid-DNA sämtlicher 712 Klone (siehe Beispiel 1) wurde nach der Sanger-Methode auf einem ABI-377 Prism Gerät sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels der BioScout-Software (LION, Heidelberg) annotiert und Datenbankvergleichen (Genbank)
25 unterzogen. Von 712 Klonen konnten 678 sequenziert und annotiert werden. Der Rest (34) wies als Insert entweder nur poly(A) Sequenzen auf oder entsprach einem religierten Vektor oder war nicht sequenzierbar. Von den 678 annotierbaren Sequenzen erwiesen sich 357 als Gene

mit bekannter Funktion. Die restlichen
321 repräsentierten Klone, kodierend für Gene mit
unbekannter Funktion; 59 davon wiesen nicht einmal
Einträge in der humanen EST-Datenbank auf. Bekannte Gene
5 wurden nicht weiter behandelt. Für jene unbekannten
Gene, für die ein EST-Eintrag verfügbar war, wurde eine
Abschätzung des Expressionsprofils vorgenommen: dabei
wurden all jene ESTs mit > 95% Identität (BLAST), die
zur entsprechend experimentell ermittelten Sequenz der
10 Subtraktionsbibliotheken gehörten, überprüft. Bei der
Annotation wurde eine Unterteilung in a) kritische
Normalgewebe, b) fötale, "verzichtbare" und
immunprivilegierte Gewebe und c) Tumore und Tumor-
Zelllinien vorgenommen. Auf der Basis dieses "virtuellen
15 mRNA-Profiles" ("virtueller Northern blot") wurden
200 Klone, für die keine ESTs in der Gruppe a) gefunden
wurden, für weitere experimentelle Analysen ausgewählt
(inklusive der 59 Klone, für die keine EST-Eintragung
vorlag). Zur weiteren Einengung der Kandidatenklone
20 wurden aus den von den 200 ausgewählten Klonen
ermittelten Sequenzen Oligonukleotidprimerpaare
entworfen und synthetisiert. Es wurden zunächst
8 verschiedene, von humanem Gewebe abgeleitete
cDNA-Bibliotheken (GibcoBRL "SUPERScript™"), welche
25 direktional in pCMV-SPORT kloniert sind, mittels
qualitativer PCR auf das Vorhandensein der jeweiligen
Kandidaten getestet. Die dabei eingesetzten
cDNA-Bibliotheken stammten aus Gewebe von Herz
(#10419-018), Leber (#10422-012), Leukozyten
30 (#10421-022), Niere (#10420-016), Lunge (#10424-018),
Testis (#10426-013), Gehirn (#10418-010) und fötalem
Gehirn (#10662-013). Die PCR-Bedingungen waren wie

folgt: 20 µl Gesamtvolumen pro PCR-Ansatz enthielten
1 x TaqPol-Puffer (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH9,
0,1% Triton X-100), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Promega),
0,025 U/µl Taq-DNA-Polymerase (Promega), jeweils 5 pM an
5 spezifischen Oligonukleotidprimer für B345 (B345-D,
SEQ ID NO: 34) und (B345-U, SEQ ID NO: 35) sowie 100 ng
der jeweils zu untersuchenden Plasmid-DNA. Zur Kontrolle
wurden spezifische Primer für GAPDH (SEQ ID NO:36
und 37) eingesetzt. Zur Überprüfung des selektiven
10 Nachweises wurden die jeweiligen B345 spezifischen
Primerpaare Oligonukleotidprimer (SEQ ID NO:34) und (SEQ
ID NO:35) parallel auch auf das isolierte Plasmid mit
dem B345 "original Fragment" hin ausgetestet
(ursprünglich isoliertes cDNA-Fragment von B345). Die
15 Nachweisbarkeit von Fragmenten der zu erwartenden Länge
mit starkem Signal in einem der kritischen Normalgewebe
(Herz, Leber, Lunge, Niere und Leukozyten), nicht jedoch
in den cDNA-Bibliotheken aus immunprivilegierten Geweben
(Gehirn, fötales Gehirn und Testis) unter diesen
20 PCR-Bedingungen (1 Zyklus: 3' 94°C; 35 Zyklen: 1' 94°C -
1' 55°C - 1' 72°C; 1 Zyklus: 7' 72°C) wurde als
Ausscheidungskriterium definiert. Mittels dieser
qualitativen PCR-Analyse konnte die Zahl der Kandidaten
auf 56 eingeengt werden; Klon B345 befand sich in dieser
25 bereits vorselektionierten Kandidatengruppe.

Beispiel 3

Expressionsanalyse durch cDNA Chip Hybridisierung

- Für das Design eines cDNA Chips wurden von der dBEST Datenbank über Nukleotid-Sequenzsuche eine Reihe von
- 5 Klonen ausgewählt, die zu verschiedensten Funktionskategorien, wie Apoptose bis zur Zellzyklus-Regulation, gehören. Insgesamt wurden 1299 IMAGE Klone (davon repräsentieren 1024 bereits bekannte Gene) bestellt und zur Kontrolle sequenziert.
- 10 Mikrotiterplatten mit Bakterien, die ca. 800 bp lange Sequenzen vom 3`Ende des Gens im Vektor enthalten, wurden an Incyte Pharmaceuticals, Inc. (USA) geschickt und diese dort auf 60 Chips gespottet. Neben diesen Klonen wurden auch 120 durch RDA identifizierten EST
- 15 Klone auf die Chips gespottet. Die so produzierten DNA Chips wurden anschließend mit Cy3 markierter cDNA aus Normalgewebe, Tumorgewebe und Zelllinien zusammen mit Cy5 markierter cDNA aus einer Mischung von neun verschiedenen Normalgeweben hybridisiert und die beiden
- 20 Signale zur Normalisierung der Expressionswerte verglichen. Die Berechnungen erfolgten teilweise in S-Plus oder in Microsoft Excel. Die Auswertung der Chip Experimente ergab ein sehr ähnliches Expressionsprofil für B345, B540 und B452 bei der Hybridisierung mit
- 25 Lungenkrebs Proben von Zelllinien und Patientenmaterial (Siehe Fig. 1A). Solch ein tumorassoziiertes Expressionsprofil konnte für B345 auch bei Vergleich von Kolon Adenokarzinom mit Kolon Normalgewebe gezeigt werden (Siehe Fig. 1B).

Das Sequenzalignment von B345, B540 und B452 zeigte eindeutig ein Überlappen der einzelnen EST Fragmente. Daher konnte man annehmen, dass es sich bei den drei Klonen um ESTs von ein und dem selben Gen handelt. Der
5 daraus resultierende DNA Abschnitt deckt eine Länge von 843 bp ab (Siehe Fig. 1C) und wurde in weiteren Versuchen zur Durchsuchung von öffentlichen Datenbanken verwendet. Die Suchergebnisse lieferten keine signifikante Homologie zu bekannten DNA bzw. Protein
10 Sequenzen, was darauf hindeutet, dass es sich bei B345 um ein bis lang unbekanntes Gen handelt.

Beispiel 4

Expressionsanalyse von B345 mittels Northern Blots

15 Bei B345 handelt es sich um ein Gen, das laut DNA Chip Analysen in Tumorgewebe (siehe Fig. 1A und 1B, Tab. 1a und Tab. 1B) hochreguliert ist.

Um einerseits das erhaltene Transkriptionsprofil zu bestätigen und andererseits die Länge der zu erwartenden
20 mRNA für die full size Klonierung zu bestimmen, wurde für B345 eine Northern Blot Analyse unter Einsatz von humanen Zelllinien und des "Human Multiple Tissue Northern Blots" (Clontech und Invitrogen) durchgeführt. Als Sonden dienten die mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (NEN, Boston)
25 markierten 490 bp bzw. 318bp langen PCR Produkte von B345 (Primer (SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:6 bzw. SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:8)). Die Hybridisierung erfolgte bei 68° für 2 h; die Visualisierung durch Standard-Autoradiografie (Hyperfilm, Amersham). Fig. 2A, 2B und

2C sowie Tab. 1a und Tab. 1B, 1C zeigen das Ergebnis dieser Analyse: Fig. 2A von der Zelllinie A549, Fig. 2B von 12 Normalgeweben (Periphere Blut Lymphozyten (PBL), Lunge, Placenta, Dünndarm, Leber, Niere, Milz, Thymus, Kolon, Skelettmuskel, Herz und Hirn) und Fig. 2C von 8 Krebszelllinien (Promyelozytische Leukämie HL60, HeLa-S3, chronische myelogene Leukämie K-562, lymphoblastische Leukämie MOLT-4, Burkitt's Lymphom (Raji), Kolon Adenokarzinom SW480, Lungen Adenokarzinom A549 und Melanom G361). Das B345-Transkript zeigt eine Länge von 6,5 kb.

Beispiel 5

Analyse des Expressionsprofils von B345 auf RNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR (real time PCR oder TaqMan-Analyse)

Um eine exaktere Quantifizierung der mRNA Expression in den verschiedenen normal und Tumorgeweben durchzuführen, wurde die "real time PCR" angewandt, die es erlaubt die RNA Konzentration im Vergleich zu einen externen Standard zu berechnen.

Die Isolierung der RNA aus Gefriergewebe erfolgte mit Trizol gemäß dem Herstellerprotokoll von Gibco. Zur Entfernung von etwaig kontaminierender DNA wurde die präparierte RNA wie folgt mit DNAase I verdaut: 3 µg Gesamt-RNA wurden mit 20 µl 5x AMV Puffer (Promega), 1 µl RNasin (Promega) und 2 µl DNase I (Boehringer Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 80 µl 15 Minuten bei 37°C inkubiert. 120 µl Phenol : Chloroform :

Isoamylalkohol (25:24:1) wurden zugegeben, auf einem Vortexer gemischt und kurz abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 120 µl Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) versetzt und wie vorher
5 zentrifugiert. Die gereinigte RNA wurde Ethanol-gefällt und in Wasser gelöst.

Anschließend wurde die Gesamt-RNA mit reverser Transkriptase (Superscript, Gibco, BRL) in cDNA umgeschrieben: Zu 3 µg Gesamt-RNA wurden 1 µl Oligo dT
10 primer (Promega) zugegeben und mit Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 70°C wurde die Lösung 5 Minuten bei Zimmertemperatur abgekühlt. 5 µl RT reaction buffer (5x, Gibco, BRL), 2,5 µl dNTPs (je 10 mM, Boehringer
15 Mannheim), 1 µl RNasin (10U/µl, Promega), 1,5 µl Superscript (10 U/µl, Gibco, BRL) und 5 µl Wasser wurden zugegeben und 1 Stunde bei 42°C inkubiert und die Reaktion durch Inkubation von 3 Minuten bei 95°C beendet.

20 Zur Herstellung eines cDNA-pools eines bestimmten Gewebe oder Tumortyps wurden 3 bis 10 verschiedene Einzelpräparationen von unterschiedlichen Patienten in gleichen Anteilen gemischt.

Die quantitative Bestimmung der "Haushaltsgene" β -Aktin,
25 GAPDH und Tubulin in cDNA-pools wurde wie folgt durchgeführt:

A) β -Actin-TaqMan PCR (Perkin Elmer)

Details über das Prinzip der TaqMan Methode siehe Herstellerinformation (Perkin Elmer). Ein TaqMan PCR

Lauf beinhaltete Proben an β -Actin-Kontrollsequenz mit je 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 Kopien/ μ l (Perkin Elmer) zur Bestimmung der Standardkurve, eine Negativkontrolle ohne DNA und die zu quantifizierenden cDNA-pools. Alle Proben

5 wurden in Triplikaten analysiert. Für einen 25 μ l Reaktionsansatz wurden 1 μ l cDNA, 2,5 μ l 10 \times Puffer A (Perkin Elmer), 4 μ l $MgCl_2$ (25 mM, (Perkin Elmer)), 0,5 μ l je Nukleotid (10 mM dATP, dCTP, dGTP; 20 mM dUTP), 0,125 μ l TaqMan Sonde (20 μ M; TaqMan Sonde für

10 β -Aktin (SEQ ID NO: 20) fluoreszenzmarkiert am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein und mit 6-Carboxytetramethylrhodamine am 3'-Ende), 1 μ l je β -Aktin spezifischer Primer (je 20 μ M, Forward Primer SEQ ID NO:21 und Reverse Primer SEQ ID NO:22), 0,25 μ l

15 AmpErase uracil N-Glycosylase "UNG" (1 U/ μ l, Perkin Elmer), und 0,125 μ l AmpliTaq Gold (5 U/ μ l, Perkin Elmer) gemischt, in MicroAmp Optical Tubes (Perkin Elmer) überführt und mit MicroAmp Optical Caps verschlossen. Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

20 ein Zyklus mit 2 Minuten 50°C für die UNG Reaktion, ein Zyklus 10 Minuten 95°C zur Aktivierung der AmpliTaq, 40 Zyklen mit je 15 Sekunden 95° und 1 Minute 60°C. Anschließend wurden die Proben auf 25°C gehalten. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm "Sequence

25 Detection System 1.5b1" (PE Applied Biosystems), wobei im Prinzip die Fluoreszenzsignale der zu quantifizierenden cDNA-Proben mit den Signalen der Kontrollplasmidverdünnungen bekannter Konzentration verglichen wurden.

30 B) GAPDH-TaqMan PCR

Für die Quantifizierung von GAPDH, das wie β -Aktin oder Tubulin zur Normalisierung der eingesetzten RNAs verwendet wurde, sind folgende Primer bzw. Sonden eingesetzt worden. Als TaqMan Sonde für GAPDH diente
5 (SEQ ID NO: 23) eine am 5'-Ende mit Tetrachlorfluorescein und am 3'-Ende mit Carboxymethylrhodamin markierte Sonde (Forward GAPDH Primer: SEQ ID NO: 24 und Reverse Primer: SEQ ID NO:25). Die Reaktionen wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

10 C) Tubulin-SybrGreen PCR (Perkin Elmer)

Prinzip der SybrGreen PCR siehe Herstellerinformation (Perkin Elmer). Ein SybrGreen PCR Lauf beinhaltete Proben an Tubulin-Kontrollplasmid mit je 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 Kopien/ μ l (Perkin Elmer) zur Bestimmung der
15 Standardkurve, eine Negativkontrolle ohne DNA und die zu quantifizierenden cDNA-pools. Alle Proben wurden in Triplikaten analysiert. Für einen 25 μ l Reaktionsansatz wurden 1 μ l cDNA, 2,5 μ l 10x SybrGreen Puffer (Perkin Elmer), 3,5 μ l $MgCl_2$ (25 mM, Perkin Elmer)), 0,5 μ l je
20 Primer (je 20 μ M, Perkin Elmer, Tubulin Forward (SEQ ID NO:26); Tubulin reverse (SEQ ID NO:27), 0,25 μ l AmpErase uracil N-Glycosylase "UNG" (1 U/ μ l, Perkin Elmer), und 0,25 μ l AmpliTaq Gold (5 U/ μ l, Perkin Elmer) gemischt, in MicroAmp Optical Tubes (Perkin Elmer) überführt und
25 mit MicroAmp Optical Caps verschlossen. Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt: ein Zyklus mit 2 Minuten $50^\circ C$ für die UNG Reaktion, ein Zyklus 10 Minuten $95^\circ C$ zur Aktivierung der AmpliTaq, 40 Zyklen mit je 15 Sekunden 95° und 1 Minute $60^\circ C$. Anschließend wurden die
30 Proben auf $25^\circ C$ gehalten. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm "Sequence Detection System

1.5b1" (PE Applied Biosystems), wobei im Prinzip die Fluoreszenzsignale der zu quantifizierenden cDNA-Proben mit den Signalen der Kontrollplasmidverdünnungen bekannter Konzentration verglichen wurden.

5 D) B345-TaqMan PCR

Die quantitative TaqMan-PCR-Analyse von B345 wurde, wie für die "Haushaltsgene" beschrieben, durchgeführt. Es wurden jedoch B345 spezifische Primer (SEQ ID NO:28 und SEQ ID NO:29) (200 ng/ μ l) und eine B345 spezifische
10 Sonde (SEQ ID NO:30, 20 μ M), die am 5'-Ende mit Tetrachlorfluorescein und am 3'-Ende mit Carboxymethylrhodamin markiert ist, verwendet. Als Standard wurde das PCR Produkt von B345 mit den Primern SEQ ID NO:28 und SEQ ID NO:29 mit bekannter Kopienzahl
15 eingesetzt.

Fig. 3 veranschaulicht die TaqMan- Expressionsanalyse (Fig. 3A: β -Actin; Fig. 3B: Tubulin). Es zeigte sich, dass B345 höher in Dickdarmkrebsgewebe als in Normalgewebe exprimiert ist (siehe Tab. 2a). Nun stellt
20 aber sowohl das Normalgewebe als auch das Tumorgewebe ein sehr heterogenes Gemisch von verschiedenen Zelltypen dar. Weiteres variiert der Anteil von Tumorzellen im Tumorgewebe sehr stark von etwa 30 bis 80%. Um diese biologische Heterogenität auf ein Minimum zu
25 beschränken, wurden die Epithelzellen des Dickdarms, die die Ursprungszellen des Adenokarzinoms darstellen, und die Krebszellen oder Krebsareale durch Laser-Mikrodissektion spezifisch präpariert. Gewebeschnitte von 10 μ m Stärke wurden mit dem Kyromikrotom von Leica,
30 Jung CM1800 angefertigt und auf einen mit Polyethylen

beschichteten Objektträger aufgebracht (Böhm et al., 1997). Die bei Raumtemperatur für etwa 30 Minuten getrockneten Schnitte wurden mit Mayers Hämatoxylin (SIGMA DIAGNOSTICS) inkubiert und anschließend zur

5 Entfernung von unspezifisch gebundenen Farbstoff fünf Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Nach fünf minütigem Trocknen bei 37°C wurde die Laser-

Mikrodissektion durchgeführt. Dafür wurde das Lasermikroskop von PALM (PALM GmbH, Bernried,

10 Deutschland) eingesetzt und etwa 2000 bis 5000 Zellen präpariert. Die durch Reverse Transkription gewonnene cDNA, wurde auch hier durch Real Time PCR analysiert. Das Ergebnis zeigt, dass die B345 Expression in

Dickdarmkarzinom Zelllinien sowie in Patientenmaterial

15 um ein Vielfaches höher ist als vergleichsweise die des Dickdarmnormalgewebes. Zur Normalisierung wurde der Expressionslevel von GAPDH bestimmt (siehe Fig. 4 und Tab. 2B).

Beispiel 6

a) Klonierung der cDNA von B345

Das Durchsuchen von Datenbanken nach Sequenzen von Genfragmenten (ESTs, expressed sequence tags), die für die „in silico“ Klonierung von B345 herangezogen werden können, ergab ein überlappendes EST-Kontig von etwa 1500 bp. Der polyA-Bereich an einem der Enden gab Hinweis auf die Orientierung des DNA Abschnittes in Bezug auf 5' - 3' Orientierung, was beim Design von neuen Primern für die Amplifikation von B345-spezifischen cDNA-Fragmenten essentiell ist.

Zunächst wurde das durch die Datenbankanalyse beschriebene potentielle 3' Ende durch experimentelle Ansätze verifiziert. RNA von der Lungen-Karzinom Zelllinie Calu 6 (AACC No. HTB56) wurde mit Hilfe des Primers (SEQ ID NO:9) revers transkribiert und die resultierende einzelsträngige cDNA wurde mittels PCR mit den Gen spezifischen Primer SEQ ID NO:5 und den Adapterprimer SEQ ID NO: 10 amplifiziert.

Für einen 25 µl PCR Ansatz wurden 1 µl des cDNA-pools mit 2,5 µl 10xTaq Puffer (Promega), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM, Promega), 0,5 µl dNTPs (je 10 mM, Boehringer Mannheim), 1 µl Primermischung (je 20 µM), 0,15 µl Taq Polymerase (Promega) in Wasser gemischt. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt: 1x 94°C 3 Minuten; 30x 94°C 30 Sekunden, 55°C 30 Sekunden, 72°C 1 Minute; auf 4°C halten. Die PCR wurde auf einem 1,2% Agarosegel analysiert.

Die beiden Primer wurden anschließend zum Sequenzieren des gereinigten PCR Produktes verwendet. Die ermittelten

Sequenzen zeigten eine hohe Homologie mit dem "in silico" klonierten DNA Abschnitt (inklusive des PolyA-Trakts).

Da das Klonieren von 5'-Endsequenzen einen meist sehr aufwendigen Prozess darstellt, wurden im Folgenden zur Lösung des Problems verschiedene Methoden angewandt.

Als Ausgangszelllinie wurde auch hier Calu 6 verwendet. Nach der reversen Transkription der RNA mit dem Primer SEQ ID NO:9 und der Zweitstrangsynthese wurde an die Doppelstrang-cDNA ein Linker bestehend aus den beiden Oligos SEQ ID NO:11 und SEQ ID NO:12 ligiert (Abe et al., 1992). Die daraus resultierende LoneLinker cDNA Bibliothek wurde dann mit dem Gen spezifischen Primer SEQ ID NO:6 linear über 35 Zyklen amplifiziert. Ein Aliquot der B345 angereicherten cDNA konnte anschließend mit den Primern SEQ ID NO:13 und LLEcoRIA SEQ ID NO:11 weiter amplifiziert werden. Nach der Gelelektrophorese eines Aliquots und Southernanalyse mit dem genspezifischen Oligo SEQ ID NO:14 konnte eine 5 kb Bande lokalisiert werden. In weiterer Folge wurde dieses Fragment schrittweise sequenziert und auf die Sequenz des EST-Kontigs ausgerichtet ("aligned").

Um die resultierende Sequenz aus der LLcDNA Klonierung zu überprüfen, wurden zwei Fragmente mittels PCR (SEQ ID NO:15 und SEQ ID NO:16 bzw. SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:17) amplifiziert und für das Screenen von Lambda gt10 cDNA Phagen Bibliotheken eingesetzt. Positive Plaques wurden isoliert und mittels den gt10 spezifischen Primern (SEQ ID NO:18 und SEQ ID NO:19) PCR amplifiziert. Anschließende Sequenzierung und das

Alignment mit den Sequenzen führte zu der Annahme, das es sich hierbei um ein differenzielles Spleißprodukt handelt. Die Spleißdonor, Akzeptor und Lariatsequenz konnten in weiterer Folge gefunden werden. Mittels PCR
5 durch geeigneter Primerkombination wurde in verschiedenen Zelllinien nach differenziellen Spleißprodukten gesucht, wobei in allen gescreenten Zelllinien nur ein Produkt gefunden wurde und zu der in Fig. 5 dargestellten Genstruktur führte. Die angeführte
10 cDNA besitzt einen offenen Leserahmen (ORF) der für ein potentiell Protein mit einer Länge von 749 Aminosäuren kodiert. Die Translationsinitiationsstelle an Position 215 entspricht zu etwa 75% einer Kozak-Konsensussequenz. Die in diesem Experiment erhaltenen
15 Ergebnisse veranlassten dazu, in einem weiteren Experiment (Beispiel 6b) die Transkriptionsinitiationsstelle noch exakt durch Primer-Extension zu bestimmen, um sicher zu gehen, dass das hier ermittelte 5' Ende das tatsächliche 5'-Ende von
20 B345 ist. Die von der in diesem Klonierungsversuch erhaltenen cDNA (SEQ ID NO:1) abgeleitete Aminosäuresequenz von B345 ist in SEQ ID NO:2 gezeigt.

b) Zweiter Klonierungsversuch; Bestimmung der 5'-und der Promotorregion von B345

25 Mit Hilfe des Promotor Finder DNA Walking Kit (Clontech) und anschließender Primerextension Reaktion wurden die 5'-Region und die Promotorregion sowie die exakte Transkriptionsinitiationsstelle bestimmt. Die 5'-Region wurde mit Hilfe einer genomischen DNA Library von
30 Clontech mit B345 spezifischen Primern (SEQ ID NO:38 bzw. nested SEQ ID NO:39) und Adaptor Primer im Kit

amplifiziert. Um den exakten Transkriptionsstart zu bestimmen, wurde die Primer Extension Reaktion durchgeführt. Dafür wurde der Primer SEQ ID NO:40 am 5'-Ende mit Hilfe 10 U der T4 Polynukleotid Kinase (Promega) und 3 µl [γ - 32 P]ATP (3000Ci/mmol) nach Standard-Protokollen markiert (Sambrook et al., 1989). Das markierte Oligonukleotid wurde durch Präzipitation gereinigt. Für die Primerextension Reaktion wurden 10.000 cpm Oligonukleotid in einem Gesamtvolumen von 20 µl zu 25 µg Total RNA der Colo 205 Zelllinie (ATCC:CCL-222) eingesetzt.

Die RNA der Zelllinie wurde mit dem radioaktiv markiertem Primer revers transkribiert und auf ein 10%- Polyacryamidgel aufgetragen. Zur Bestimmung der genauen Bandenlänge wurde ein PCR Fragment von nt 1000 - nt 1362 mit 35 S markierten Nukleotiden sequenziert und ebenfalls aufgetragen. Das aus der Elongation des reversen Primers resultierende Fragment von 209 Nukleotiden legt den Transkriptionsstart genau an Position 201 fest. Somit wurde die in Beispiel 6a erhaltene B345-Sequenz in der 5'-Region erweitert und ein neues Startkodon auf Position 283 bestimmt. Durch wiederholte Sequenzierungen auch in der 3'-Region wurde, im Vergleich zur in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, eine zusätzliche Base an Position 2430 gefunden, die zu einer Leserasterverschiebung führt und somit das Stoppcodon von Position 2729 auf 2791 verschiebt. Die in diesem Versuch erhaltene cDNA (SEQ ID NO:3) besitzt einen offenen Leserahmen, der für ein potentiell Protein mit einer Länge von 836 Aminosäuren (SEQ ID NO:4) kodiert.

Beispiel 7

Bioinformatik-Analyse zur Funktion von B345

Die resultierende primäre Aminosäuresequenz von B345 ist
5 in SEQ ID NO:4 gezeigt. Die Analyse des Hydrophilizitäts
Plots der Aminosäuresequenz mit der Methode von Kyte und
Doolittle (1982) zeigt, dass das B345 Protein zwei
charakteristische hydrophobe Domänen aufweist
(Aminosäuren Pos. 1 - 29 und 666 - 691), die ein
10 Signalpeptid und eine helikale Transmembrandomäne
darstellen (Fig. 6). Diese polarisierte Struktur deutet
darauf hin, dass es sich bei B345 um ein integrales
Membranprotein handelt. Die Transmembranhelix verbindet
einen etwa 666 Aminosäuren langen extrazellulären und
15 einen kurzen (145 Aminosäuren) intrazellulären Teil
(siehe Fig. 7).

Die extrazelluläre Domäne weist außerdem klare Indizien
für die Existenz einer CUB Domäne bei Position 220 - 350
sowie Indizien für 2 mögliche weitere CUB Domänen im
20 Bereich der Aminosäuren 425 - 660 auf. CUB Domänen
kommen bei verschiedenen, meist während der
Embryonalentwicklung regulierten Proteinen vor. Außerdem
sind manchmal bei EGF (Epidermal Growth
Factor)-ähnlichen Domänen auch CUB Domänen anzutreffen.
25 Eine kürzlich erschienene Publikation (Gerstein et al.,
2000) demonstriert, daß CUB Domänen enthaltende Proteine
die am ausgeprägtesten differenziell regulierten
Proteine in *C. elegans* sind. Da Gene, die eine
Schlüsselrolle in der Embryonalentwicklung haben, auch
30 analoge Funktionen in Krebs ausführen, kann angenommen

werden, dass eine Überexpression von B345 in Zellen eine Veränderung in den Eigenschaften der Substratadhäsion oder der extrazellulären Matrix bewirkt. Das Protein weist außerdem 12 potentielle N- Glycosylierungsstellen
5 auf, die in der vorhergesagten extrazellulären Domäne zu finden sind, was mit der vorhergesagten Orientierung des Proteins übereinstimmt.

Mit einem BLAST hit (E-value: 5.8×10^{-2}) für den Bereich der Aminosäuren von 235 bis 282 von B345 konnte eine
10 Komplement aktivierende Komponente des *RA-reactive factor* (RARF) aus *mus musculus* identifiziert werden. Das Alignment befindet sich innerhalb der CUB Domäne 1 von B345.

Die CUB-Domänen 2 and 3 (Bereich 425-535 und 545-660)
15 weisen marginale Homologien zu dem humanen und Fugu Prokollagen C-Proteinase Enhancer Protein (PCOLCE) auf. Diese Regionen kommen in dem Bereich von PCOLCE vor, welcher ein CUB Domänen Tandem Repeat enthält (E-values: 0.5 (human) und 2.7 (Fugu)). CUB Domänen kommen manchmal
20 in Repeats vor.

Vermutlich bildet das B345-Protein eine β -Sheet Sekundärstruktur, da sich CUB Domänen bekanntlich als β -Sandwich falten.

Die intrazelluläre Domäne (Bereich 691-836) weist keine
25 signifikanten Homologien auf. Der gesamte C-Terminus aligned jedoch mit einem EST (AW063026) von humanen Eierstockkrebs Zellen (82% Identität über 124 Aminosäuren).

Beispiel 8

Bestimmung der genauen Genstruktur von B345

Zunächst wurden Bac Klone in öffentlichen Datenbanken (BLAST search) gesucht, die das B345-Gen enthalten. Die
5 Bac Klone Ac068625 und Ac010170 enthielten einen Großteil des Gens. Mit intronspannenden Primern wurden Spliceakzeptor und Donorsequenzen in Colo 205 cDNA und genomischer DNA als Template gesucht. Das PCR Protokoll wurde wie folgt durchgeführt: 1x 95°C 2 Minuten,
10 35x 95°C 15 Sekunden, 68°C 3 Minuten und dann auf 4°C gehalten. Die PCR wurde auf einem 1,2% Agarosegel analysiert und dabei die Längen der PCR Produkte der 2 Templates mit gleichen Primerkombinationen verglichen. Es stellte sich heraus, dass B345 aus 8 Exons, getrennt
15 von 7 Introns besteht (Fig. 5).

Die chromosomale Lokalisation des Gens wurde mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) bestimmt. Dabei wurde die humane, Digoxigenin-markierte B345 Sonde zusammen mit der Biotin-markierten Sonde von B47a2
20 (Knight et al., 1997), welche sich auf der sub-telomerischen Region des Chromosomenarms 3p befindet, mit Metaphase-Chromosomen zweier "normaler" Individuen hybridisiert (Lichter et al., 1988). Die hybridisierte Digoxigenin-Sonde wurde mittels Anti-Schaf-Dig
25 (Boehringer Mannheim FRG) und Kaninchen Anti-Schaf FITC-markierten Antikörpern detektiert. Die Biotin markierte Probe dagegen wurde mit Maus Anti-Biotin und Kaninchen-Anti-Maus (TRITC) und anschließende Färbung mit DAPI sichtbar gemacht. Die FISH Resultate zeigen, dass eine
30 Mehrheit der Metaphasen eindeutige Signale an einem oder

beiden Chromatiden des Chromosoms 3 in der Region p21-p23 haben. Als Bestätigung der Position diene die Co-lokalisierung der B47a2 (TRITC)-Sonde auf dem selben chromosomalen Arm.

Tab. 1A

Gewebe	Expression
PBL	-
Lunge	++
Plazenta	+
Dünndarm	+
Leber	-
Niere	++
Milz	-
Thymus	-
Kolon	+
Skelettmuskel	-
Herz	-
Hirn	-

Tab. 1B

Zelllinie	Expression
promyelocytische Leukämie HL60	-
HELA Zellen S3	-
Chronische Myelogene Leukämie K-562	+
Lymphoblastische Leukämie MOLT-4	-
Burkitt's Lymphom (Raji)	-
Kolon Adenokarzinom SW480	+++
Lungen Adenokarzinom A549	+
Melanom G361	-

Tab.1C

Gewebe	Expression
Speiseröhre Tumor	(+)
Speiseröhre Normal	(+)
Magen Tumor	-
Magen Normal	+
Kolon Tumor	+++
Kolon Normal	++
Mastdarm Tumor	+
Mastdarm Normal	(+)

Tab. 2A

Gewebe	Expression B345/ Acin	Expression B345/ Tubulin
Lunge Adenokarzinom	+	+
Lunge Adenokarzinom	+	+
Lunge Normal	- bis (+)	(+)
Kolon Adenokarzinom	++	++
Kolon Adenokarzinom	+++	+++
Kolon Normal	- bis (+)	+
Mamma IDC	+	+
Brust	-	-
Hodgkin's Lymphom	-	-
Milz	-	-
Testis	-	-

Tab. 2B

Zelllinien und Gewebe	Expression B345 / GAPDH
Kolon Adenokarzinom SW480	+
Kolon Normal (Clonotech)	(+)
Kolon Normal (Invitrogen)	(+)
Lungen Adenokarzinom A549	(+)
Kolon Adenokarzinom Colo 205	+++
PG 102142 Tumor (Colon Ac.)	+++
PG 21900 Tumor (Colon Ac.)	++
PG 7066 Tumor (Colon Ac.)	+++
PG 32389 Tumor (Colon Ac.)	++

Literatur

- Abe, K., Rapid isolation of desired sequences from lone
linker PCR amplified cDNA mixture: application to
5 identification and recovery of expressed sequences in
cloned genomic DNA. *Mamm. Genome* 2,252-259
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang,
J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. Gapped
BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein
10 database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25,
3389-3402 (1997).
- Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S. R., Howe,
K. L. and Sonnhammer, E. L. The Pfam Protein Families
Database. *Nucleic Acids Res.* 28, 263-266 (2000).
- 15 Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function
of DNA methylation. *Nature* 321:209-213.
- Bork, P. et al. (1993). The CUB domain. A widespread
module in developmentally regulated proteins. *J.Mol.*
Biol. 231: 539-545
- 20 Boulianne, G. L., et al., (1984), *Nature* 312: 643-646
- Böhm et al., *A.J. of Pathology* 151,1:63-67, 1997
- Brüggemann, M. und Neuberger, M.S., (1996), *Immunol.*
Today 17: 391-397
- Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M.
25 and Barton, G. J. Jpred: a consensus secondary

- structure prediction server. *Bioinformatics* 14,
892-893 (1998).
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik,
A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov,
5 K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D.
(1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93,
6025-6030.
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to
detect protein-protein interactions. *Nature* 20;
10 340(6230):245-6
- Gaudi C, Kremer F, Angevin E, Scott V, Triebel F
(1999), *J Immunol* 162:1730-1738
- Gerstein, M. and Jansen, R. (2000). The current
excitement in bioinformatics-analysis of whole-genome
15 expression data: how does it relate to protein
structure and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.*
10:574-584.
- Graziano, R.F., et al., (1995), *J. Immunol.* 155:
4996-5002
- 20 Griffiths, A.D., et al., (1994), *EMBO J.* 13: 3245-3260
- Grosveld, F. and Kollias, G. *Transgenic Animals*,
Academic Press (1992)
- Hamburger, A.W. and Salmon, S.E. (1977). Primary
bioassay of human tumor stem cells. *Science.* 197
25 (4302):461-463.
- Hesketh, R., (1995), *The oncogene*, Academic Press

- Higgins, D. G., Thompson, J. D. and Gibson, T. J. Using CLUSTAL for Multiple Sequence Alignments. *Methods Enzymol.* 266, 383-402 (1996).
- Hogan KT, Eisinger DP, Cupp SBC, Lekstrom KJ, Deacon
5 DD, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Slingluff CL, Ross MM (1998), *Cancer Res* 58:5144-5150
- Hofmann, K., Buchner, P., Falquet, L. and Bairoch, A. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27, 215-219 (1999).
- 10 Hubank, M. and Schatz, D.G., (1994), *Nucleic. Acids. Res.* 22, 5640-5648.
- Jakobovits, A., (1995), *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 561-566.
- Kasten, M.B., (1997), *Genetic Instability and*
15 *Tumorigenesis*, Springer Verlag
- Knight, S. J., Horsley, S. W., Regan, R., Lawrie, N. M., Maher, E. J., Cardy, D. L., Flint, J., and Kearney, L. (1997). Development and clinical
20 application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur. J. Hum. Genet.* 5:1-8.
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975), *Nature* 265, 495-497
- Kozak, M (1987), An analysis of 5`noncoding sequences
25 from 99 vertebrates messenger RNA's . *Nuc.Ac.Res.* Vol.15: 8125-8147

- Kruif, J., et al., (1995), Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 92: 3938-3942
- Kyte, J and Doolittle, RF (1982), J. Mol. Biol. 157:
105-132
- 5 Liaw, L., Skinner, M.P., Raines, E.W., Ross, R.,
Cheresh, D.A., Schwartz, S.M., and Giachelli, C.M..
(1995). The adhesive and migratory effects of
osteopontin are mediated via distinct cell surface
integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle
10 cell migration to osteopontin in vitro.
J.Clin.Invest. 95 (2):713-724.
- Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L.,
and Ward, D. C. (1988). Delineation of individual
human chromosomes in metaphase and interphase cells
15 by in situ suppression hybridization using
recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* 80:224-
234. Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van
der Bruggen P (1997) , *J Exp Med* 186:785-793
- McGuinness, B.T., et al., (1996), *Nature Biotechnol.* 14,
20 1149
- Neuberger, M.S., et al., (1984), *Nature* 312: 604-608
- Pearson, W. R. and Lipman, D. J. Improved tools for
biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 85, 2444-2448 (1988).
- 25 Puzstall et al., 1996, cell proliferation in cancer,
Oxford medical publications

- Rauscher, F.J. et al., (1997), Chromosomal translocations and oncogenic transcription factors, Springer Verlag
- Riechmann, L., et al., (1988), Nature 332: 323-327
- 5 Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A laboratory Manual" 2nd ed., Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P. and Bork, P. SMART: A Web-based tool for the study of
10 genetically mobile domains. Nucleic Acids Res. 28, 231-234 (2000).
- Toes, R.E., Hoeben, R.C., Van der Voort, E., Ressing, M.E., Van-der-Eb, A.J. Melief, C.J.M., and Offringa, R. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (26):
15 14660-14665
- Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler, KW (1995), Science 270: 484-487
- Winter, G., et al., (1994), Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455
- 20 Woelfel, T, Schneider, J, Zum Buschenfelde, Meyer, KH, Rammensee, HG, Rotzschke, O, and Falk, K (1994), Int. J. Cancer 57: 413-418
- Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho, K.R., August, J.T., and Pardoll, D.M. (1995), Proc.
25 Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(25): 11671-11675.

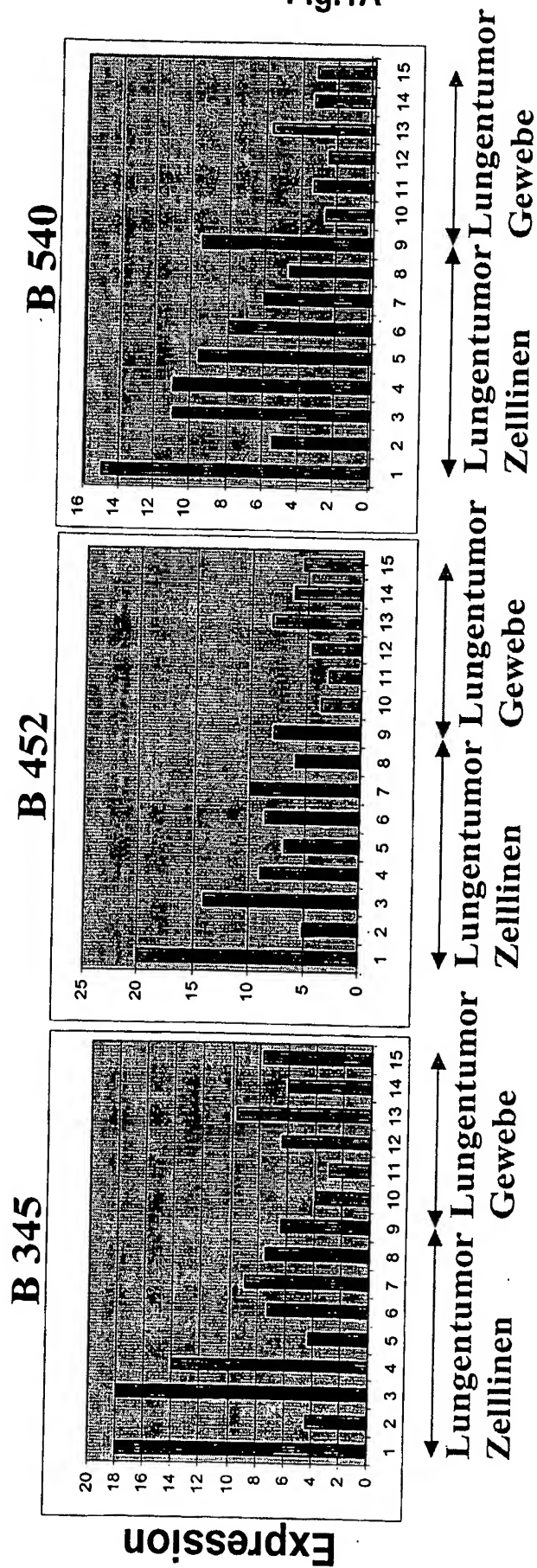
Patentansprüche

1. Tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung B345,
dadurch gekennzeichnet, dass es die in SEQ ID NO:4
definierte Aminosäuresequenz aufweist oder diese
als Teilsequenz enthält, oder ein Fragment davon.
2. Isoliertes DNA-Molekül, kodierend für das in
Anspruch 1 definierte tumorassoziierte Antigen
oder für Fragmente davon.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, dadurch
gekennzeichnet, dass es ein Polynukleotid mit der
in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz ist oder
diese Sequenz enthält oder dass es ein
Polynukleotid ist oder dieses enthält, das mit
einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:3
dargestellten Sequenz unter stringenten
Bedingungen hybridisiert, oder ein Fragment davon.
4. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend ein
DNA-Molekül gemäß Anspruch 2 oder 3.
5. Pharmazeutische Zusammensetzung für die
Immuntherapie von Krebs, enthaltend als wirksame
Komponente das in Anspruch 1 definierte
tumorassoziierte Antigen der Bezeichnung B345 oder
ein oder mehrere Fragmente davon.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung für die
Immuntherapie von Krebs, enthaltend als wirksame
Komponente ein DNA-Molekül gemäß einem der
Ansprüche 2 bis 4.

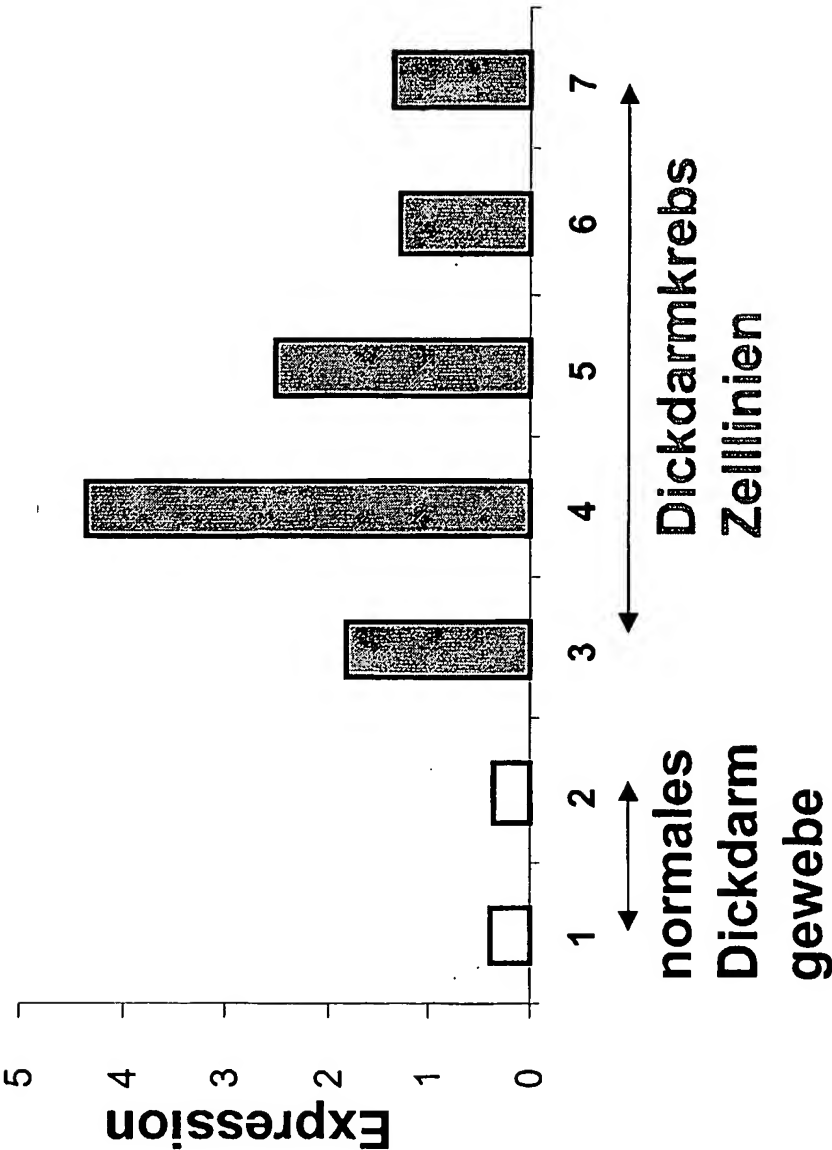
7. Antikörper gegen das in in Anspruch 1 definierte Polypeptid.
8. Antikörper nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass er monoklonal ist.
- 5 9. Antikörper nach Anspruch 7 oder 8 für die Therapie und Diagnose von Krebserkrankungen, die mit der Expression von B345 assoziiert sind.

1/12

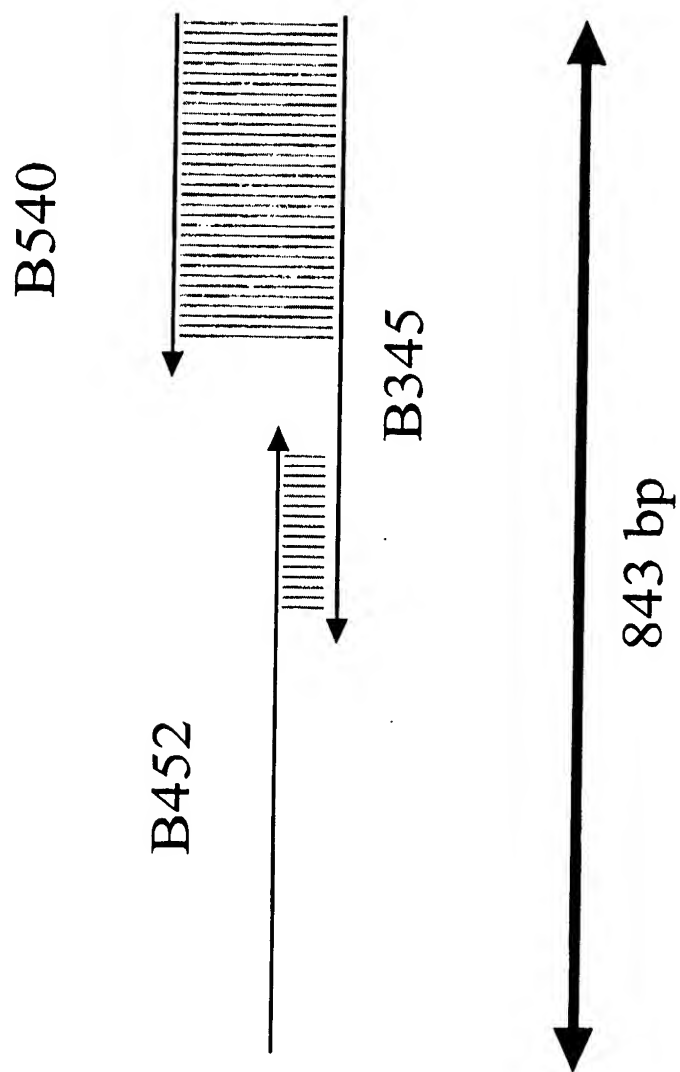
Fig.1A



2/12
Fig. 1B



3/12
Fig. 1C



4/12

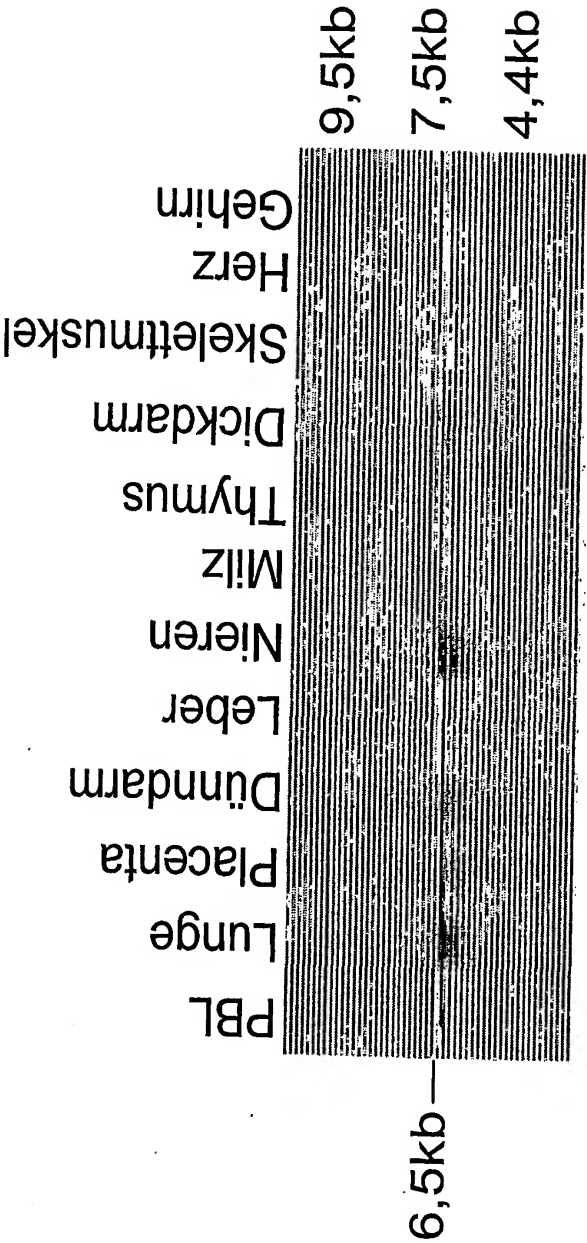
Fig. 2A

Ca. 6,5kb —

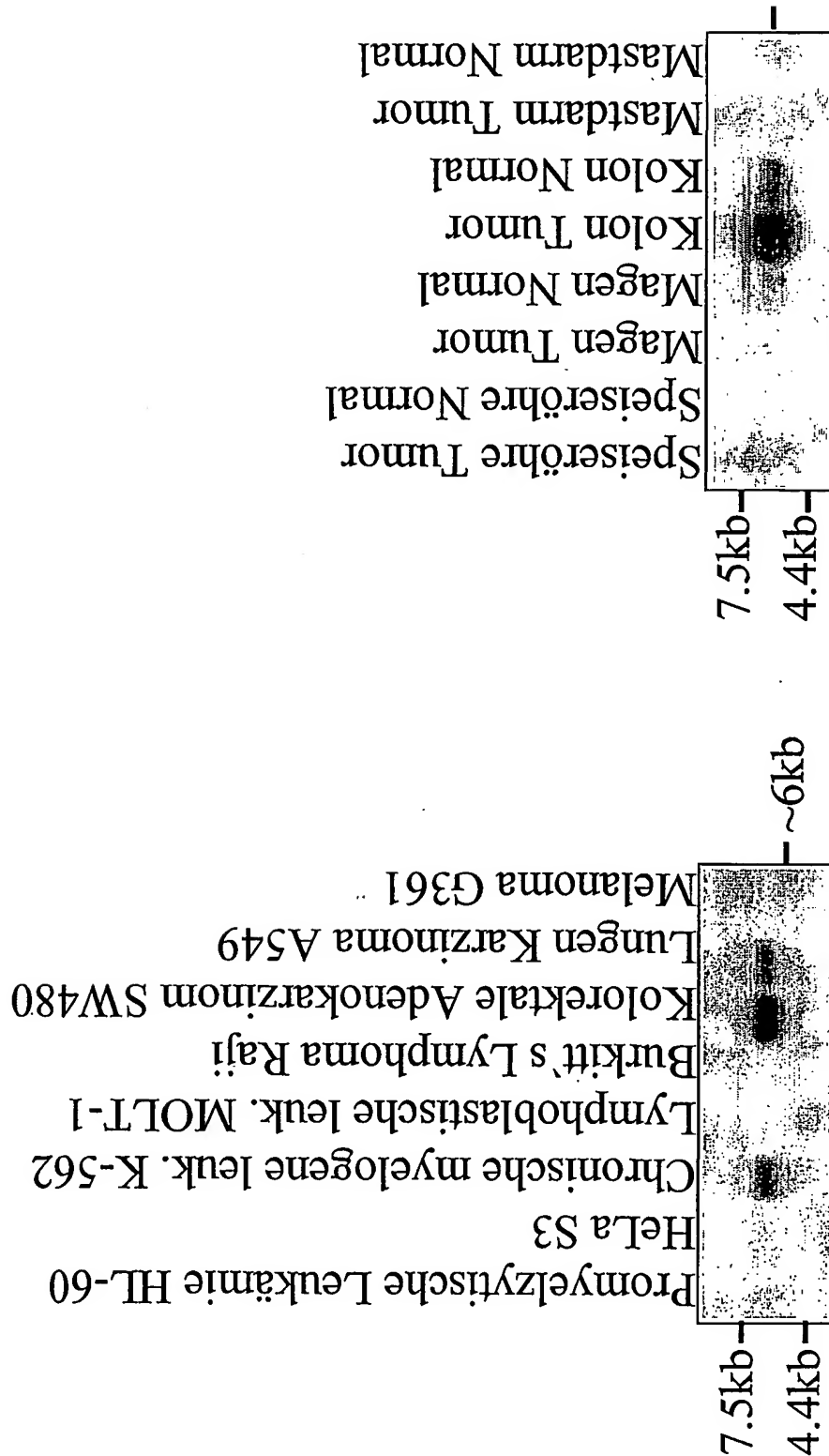
Ca. 1,9kb —



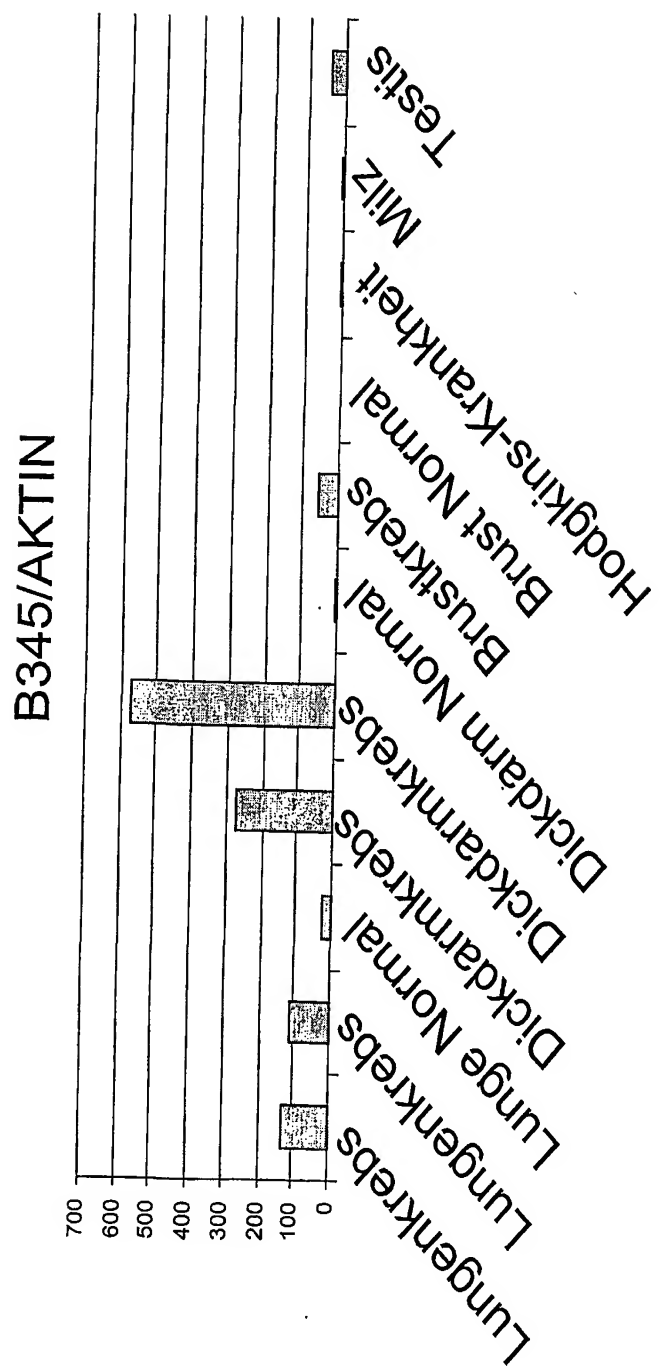
5/12
Fig. 2B



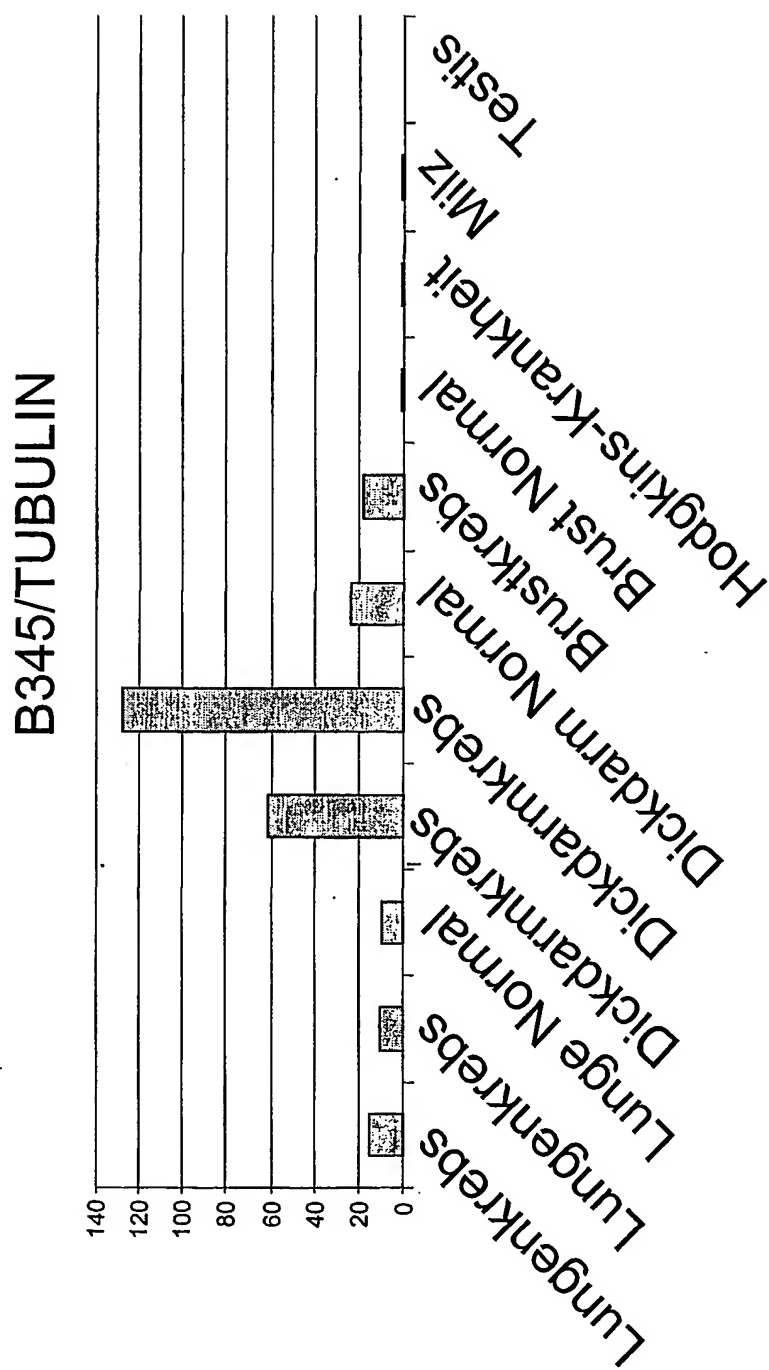
6/12
Fig. 2C



7/12
Fig. 3a

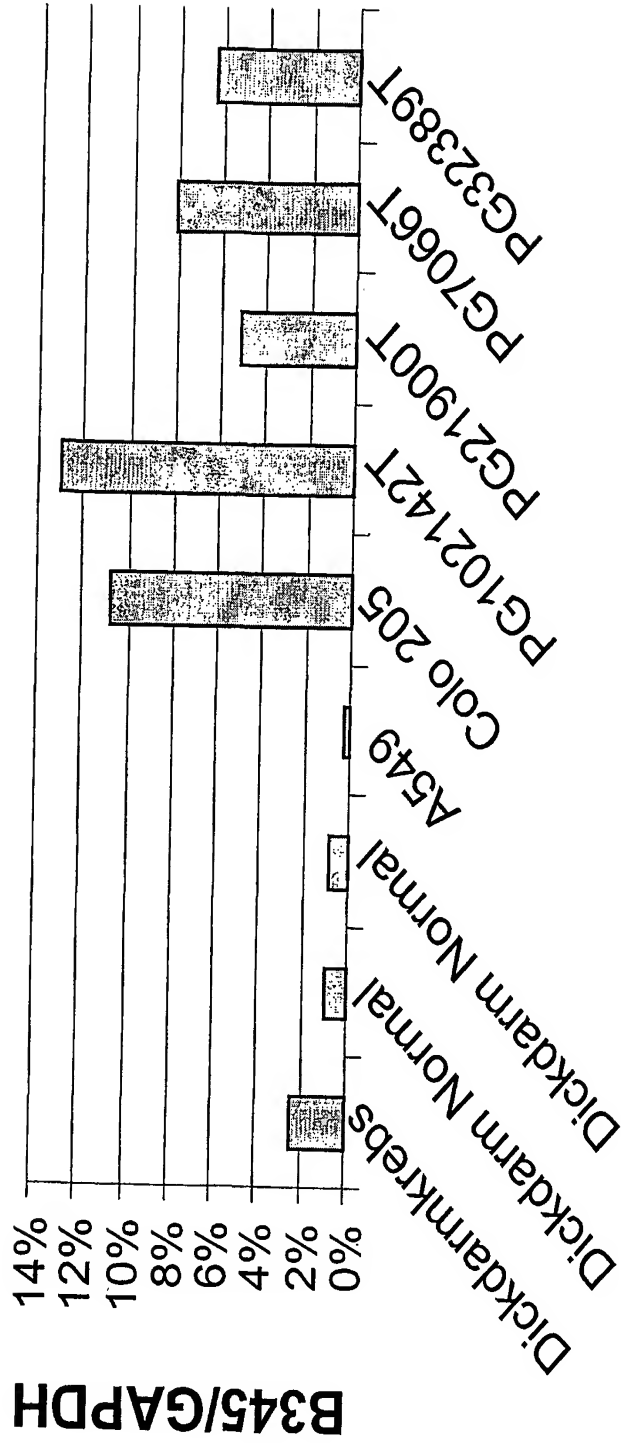


8/12
Fig. 3b



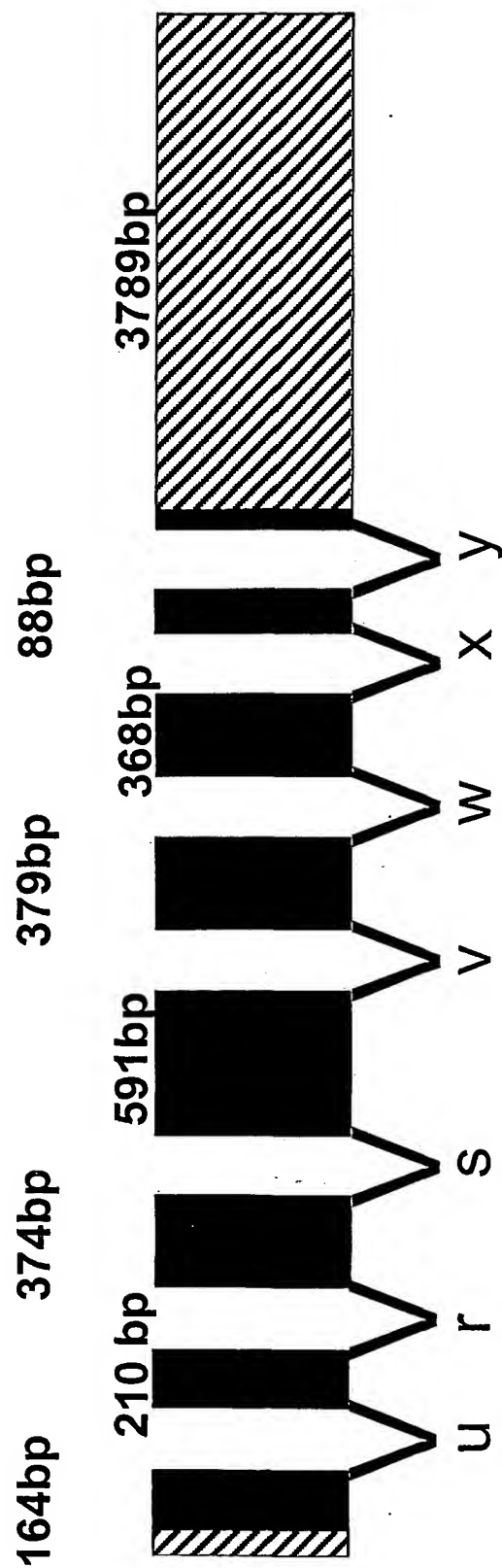
9/12

Fig. 4

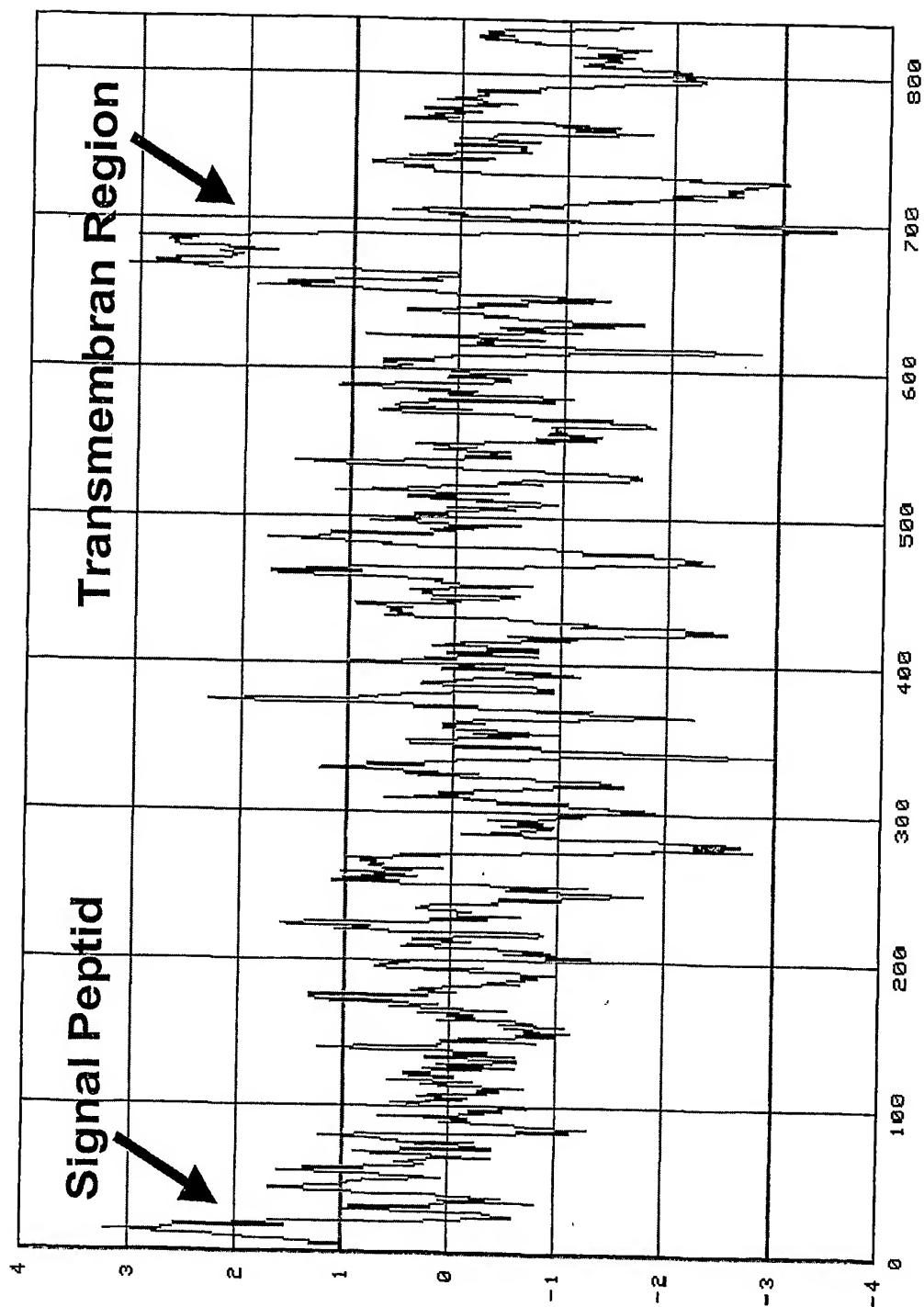


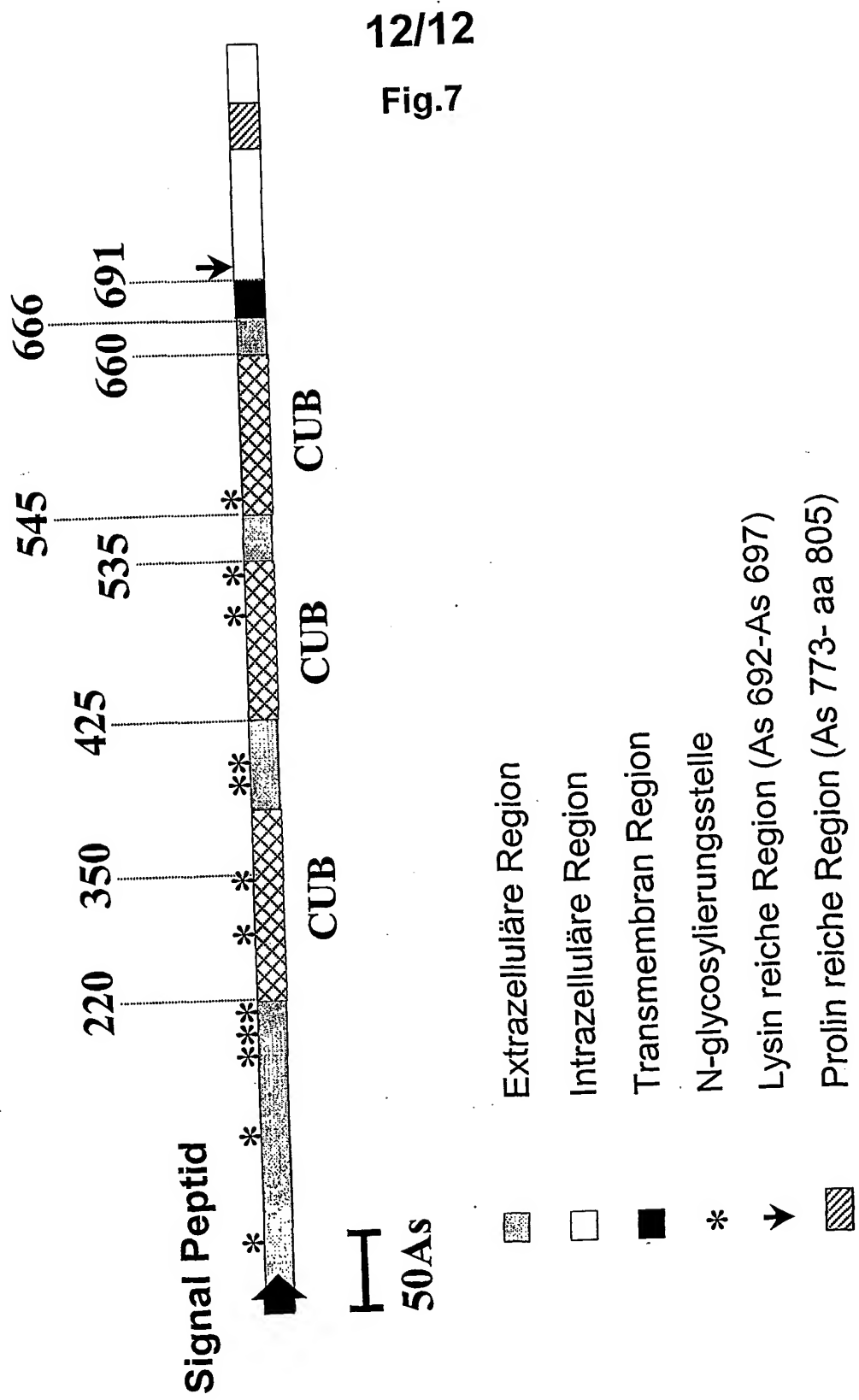
10/12

Fig. 5



11/12
Fig. 6





SEQUENZPROTOKOLL

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Tumorexprimiertes Polypeptid B345

<130> case 12_214,219

<140>

<141>

<160> 40

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5897

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(214)

<220>

<221> CDS

<222> (215)..(2464)

<220>

<221> 3'UTR

<222> (2465)..(5897)

<400> 1

cttgagatat tagaattcgc gactcctgaa ctgcgggggtc tctatcgcac tgctaggggt 60

tctgctgctg ggtgcggcgc gcctgccgcg cggggcagaa gcttttgaga ttgctctgcc 120

acgagaaagc aacattacag ttctcataaa gctggggacc ccgactctgc tggcaaaacc 180

ctgttacatc gtcatttcta aaagacatat aacc atg ttg tcc atc aag tct gga 235

Met Leu Ser Ile Lys Ser Gly
1 5

gaa aga ata gtc ttt acc ttt agc tgc cag agt cct gag aat cac ttt 283

Glu Arg Ile Val Phe Thr Phe Ser Cys Gln Ser Pro Glu Asn His Phe
10 15 20

gtc ata gag atc cag aaa aat att gac tgt atg tca ggc cca tgt cct 331

Val Ile Glu Ile Gln Lys Asn Ile Asp Cys Met Ser Gly Pro Cys Pro
25 30 35

ttt ggg gag gtt cag ctt cag ccc tcg aca tcg ttg ttg cct acc ctc 379

Phe Gly Glu Val Gln Leu Gln Pro Ser Thr Ser Leu Leu Pro Thr Leu
40 45 50 55

aac aga act ttc atc tgg gat gtc aaa gct cat aag agc atc ggt tta	427
Asn Arg Thr Phe Ile Trp Asp Val Lys Ala His Lys Ser Ile Gly Leu	
60 65 70	
gag ctg cag ttt tcc atc cct cgc ctg agg cag atc ggt ccg ggt gag	475
Glu Leu Gln Phe Ser Ile Pro Arg Leu Arg Gln Ile Gly Pro Gly Glu	
75 80 85	
agc tgc cca gac gga gtc act cac tcc atc agc ggc cga atc gat gcc	523
Ser Cys Pro Asp Gly Val Thr His Ser Ile Ser Gly Arg Ile Asp Ala	
90 95 100	
acc gtg gtc agg atc gga acc ttc tgc agc aat ggc act gtg tcc cgg	571
Thr Val Val Arg Ile Gly Thr Phe Cys Ser Asn Gly Thr Val Ser Arg	
105 110 115	
atc aag atg caa gaa gga gtg aaa atg gcc tta cac ctc cca tgg ttc	619
Ile Lys Met Gln Glu Gly Val Lys Met Ala Leu His Leu Pro Trp Phe	
120 125 130 135	
cac ccc aga aat gtc tcc ggc ttc agc att gca aac cgc tca tct ata	667
His Pro Arg Asn Val Ser Gly Phe Ser Ile Ala Asn Arg Ser Ser Ile	
140 145 150	
aaa cgt ctg tgc atc atc gag tct gtg ttt gag ggt gaa ggc tca gca	715
Lys Arg Leu Cys Ile Ile Glu Ser Val Phe Glu Gly Glu Gly Ser Ala	
155 160 165	
acc ctg atg tct gcc aac tac cca gaa ggc ttc cct gag gat gag ctc	763
Thr Leu Met Ser Ala Asn Tyr Pro Glu Gly Phe Pro Glu Asp Glu Leu	
170 175 180	
atg acg tgg cag ttt gtc gtt cct gca cac ctg cgg gcc agc gtc tcc	811
Met Thr Trp Gln Phe Val Val Pro Ala His Leu Arg Ala Ser Val Ser	
185 190 195	
ttc ctc aac ttc aac ctc tcc aac tgt gag agg aag gag gag cgg gtt	859
Phe Leu Asn Phe Asn Ser Ser Asn Cys Glu Arg Lys Glu Glu Arg Val	
200 205 210 215	
gaa tac tac atc ccg ggc tcc acc acc aac ccc gag gtg ttc aag ctg	907
Glu Tyr Tyr Ile Pro Gly Ser Thr Thr Asn Pro Glu Val Phe Lys Leu	
220 225 230	
gag gac aag cag cct ggg aac atg gcg ggg aac ttc aac ctc tct ctg	955
Glu Asp Lys Gln Pro Gly Asn Met Ala Gly Asn Phe Asn Leu Ser Leu	
235 240 245	
caa ggc tgt gac caa gat gcc caa agt cca ggg atc ctc cgg ctg cag	1003
Gln Gly Cys Asp Gln Asp Ala Gln Ser Pro Gly Ile Leu Arg Leu Gln	
250 255 260	
ttc caa gtt ttg gtc caa cat cca caa aat gaa agc aat aaa atc tac	1051
Phe Gln Val Leu Val Gln His Pro Gln Asn Glu Ser Asn Lys Ile Tyr	
265 270 275	

gtg gtt gac ttg agt aat gag cga gcc atg tca ctc acc atc gag cca 1099
 Val Val Asp Leu Ser Asn Glu Arg Ala Met Ser Leu Thr Ile Glu Pro
 280 285 290 295

cgg ccc gtc aaa cag agc cgc aag ttt gtc cct ggc tgt ttc gtg tgt 1147
 Arg Pro Val Lys Gln Ser Arg Lys Phe Val Pro Gly Cys Phe Val Cys
 300 305 310

cta gaa tct cgg acc tgc agt agc aac ctc acc ctg aca tct ggc tcc 1195
 Leu Glu Ser Arg Thr Cys Ser Ser Asn Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser
 315 320 325

aaa cac aaa atc tcc ttc ctt tgt gat gat ctg aca cgt ctg tgg atg 1243
 Lys His Lys Ile Ser Phe Leu Cys Asp Asp Leu Thr Arg Leu Trp Met
 330 335 340

aat gtg gaa aaa acc ata agc tgc aca gac cac cgg tac tgc caa agg 1291
 Asn Val Glu Lys Thr Ile Ser Cys Thr Asp His Arg Tyr Cys Gln Arg
 345 350 355

aaa tcc tac tca ctc cag gtg ccc agt gac atc ctc cac ctg cct gtg 1339
 Lys Ser Tyr Ser Leu Gln Val Pro Ser Asp Ile Leu His Leu Pro Val
 360 365 370 375

gag ctg cat gac ttc tcc tgg aag ctg ctg gtg ccc aag gac agg ctc 1387
 Glu Leu His Asp Phe Ser Trp Lys Leu Leu Val Pro Lys Asp Arg Leu
 380 385 390

agc ctg gtg ctg gtg cca gcc cag aag ctg cag cag cat aca cac gag 1435
 Ser Leu Val Leu Val Pro Ala Gln Lys Leu Gln Gln His Thr His Glu
 395 400 405

aag ccc tgc aac acc agc ttc agc tac ctc gtg gcc agt gcc ata ccc 1483
 Lys Pro Cys Asn Thr Ser Phe Ser Tyr Leu Val Ala Ser Ala Ile Pro
 410 415 420

agc cag gac ctg tac ttc ggc tcc ttc tgc ccg gga ggc tct atc aag 1531
 Ser Gln Asp Leu Tyr Phe Gly Ser Phe Cys Pro Gly Gly Ser Ile Lys
 425 430 435

cag atc cag gtg aag cag aac atc tcg gtg acc ctt cgc acc ttt gcc 1579
 Gln Ile Gln Val Lys Gln Asn Ile Ser Val Thr Leu Arg Thr Phe Ala
 440 445 450 455

ccc agc ttc caa caa gag gcc tcc agg cag ggt ctg acg gtg tcc ttt 1627
 Pro Ser Phe Gln Gln Ala Ser Arg Gln Gly Leu Thr Val Ser Phe
 460 465 470

ata cct tat ttc aaa gag gaa ggc gtt ttc acg gtg acc cct gac aca 1675
 Ile Pro Tyr Phe Lys Glu Glu Gly Val Phe Thr Val Thr Pro Asp Thr
 475 480 485

aaa agc aag gtc tac ctg agg acc ccc aac tgg gac cgg ggc ctg cca 1723
 Lys Ser Lys Val Tyr Leu Arg Thr Pro Asn Trp Asp Arg Gly Leu Pro
 490 495 500

tcc ctc acc tct gtg tcc tgg aac atc agc gtg ccc aga gac cag gtg	1771
Ser Leu Thr Ser Val Ser Trp Asn Ile Ser Val Pro Arg Asp Gln Val	
505 510 515	
gcc tgc ctg act ttc ttt aag gag cgg agc ggc gtg gtc tgc cag aca	1819
Ala Cys Leu Thr Phe Phe Lys Glu Arg Ser Gly Val Val Cys Gln Thr	
520 525 530 535	
ggg cgc gca ttc atg atc atc cag gag cag cgg acc cgg gct gag gag	1867
Gly Arg Ala Phe Met Ile Ile Gln Glu Gln Arg Thr Arg Ala Glu Glu	
540 545 550	
atc ttc agc ctg gac gag gat gtg ctc ccc aag cca agc ttc cac cat	1915
Ile Phe Ser Leu Asp Glu Asp Val Leu Pro Lys Pro Ser Phe His His	
555 560 565	
cac agc ttc tgg gtc aac atc tct aac tgc agc ccc acg agc ggc aag	1963
His Ser Phe Trp Val Asn Ile Ser Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gly Lys	
570 575 580	
cag cta gac ctg ctc ttc tgc gtg aca ctt acc cca agg act gtg gac	2011
Gln Leu Asp Leu Leu Phe Ser Val Thr Leu Thr Pro Arg Thr Val Asp	
585 590 595	
ttg act gtc atc ctc atc gca gcg gtg gga ggt gga gtc tta ctg ctg	2059
Leu Thr Val Ile Leu Ile Ala Ala Val Gly Gly Gly Val Leu Leu Leu	
600 605 610 615	
tct gcc ctc ggg ctc atc att tgc tgt gtg aaa aag aag aaa aag aag	2107
Ser Ala Leu Gly Leu Ile Ile Cys Cys Val Lys Lys Lys Lys Lys Lys	
620 625 630	
aca aac aag ggc ccc gct gtg ggt atc tac aat ggc aac atc aat act	2155
Thr Asn Lys Gly Pro Ala Val Gly Ile Tyr Asn Gly Asn Ile Asn Thr	
635 640 645	
gag atg cca ggc agc caa aaa agt ttc aga aag ggc gaa agg aca atg	2203
Glu Met Pro Gly Ser Gln Lys Ser Phe Arg Lys Gly Glu Arg Thr Met	
650 655 660	
act ccc atg tgt atg cag tca tgc agg aca cca tgg tat atg ggc atc	2251
Thr Pro Met Cys Met Gln Ser Ser Arg Thr Pro Trp Tyr Met Gly Ile	
665 670 675	
tgc tac agg att cca gcg gct cct tcc tgc agc cag agg tgg aca cct	2299
Cys Tyr Arg Ile Pro Ala Ala Pro Ser Cys Ser Gln Arg Trp Thr Pro	
680 685 690 695	
acc ggc cgt tcc agg gca cca tgg ggg tct gtc ctc cct ccc cac cca	2347
Thr Gly Arg Ser Arg Ala Pro Trp Gly Ser Val Leu Pro Pro His Pro	
700 705 710	
cca tat gct cca ggg ccc caa ctg caa agt tgg cca ctg agg agc cac	2395
Pro Tyr Ala Pro Gly Pro Gln Leu Gln Ser Trp Pro Leu Arg Ser His	
715 720 725	

ctc ctc gct ccc ctc ctg agt ctg aga gtg aac cgt aca cct tct ccc 2443
 Leu Leu Ala Pro Leu Leu Ser Leu Arg Val Asn Arg Thr Pro Ser Pro
 730 735 740

atc cca aca atg ggg atg taa gcagcaagga cacagacatt cccttactga 2494
 Ile Pro Thr Met Gly Met
 745 750

acactcagga gcccatggag ccagcagaat aacttgatcc attccagacg ctttgctgag 2554
 ttctataaag cagggcactg agacacccgt ccgtgttcct aaccagaaat cctaaagaag 2614
 aggaattata cagaaggaac agcaggaggt ttctctggac accgccaaact tcacattgct 2674
 cagtggactc attctaaggg caagacattg aaaatgatga attccaatct ggatacagtc 2734
 atgacagctc atgtgctcct caacttaggc tgtgcgggta gccagcctgt aatgagagga 2794
 gagaggcctg agtcacctag catagggttg cagcaagccc tggattcaga gtgttaaaca 2854
 gaggcttgcc ctcttcagga caacagtcc aattccaagg agcctacctg aggtccctac 2914
 tctcactggg gtccccagga tgaaaacgac aatgtgcctt tttattatta tttatttggg 2974
 ggtcctgtgt tatttaagag atcaaatgta taaccaccta gctcttttca cctgacttag 3034
 taataactca tactaactgg tttggatgcc tgggttggtga cttctactga ccgctagata 3094
 aacgtgtgcc tgtccccag gtggtgggaa taatttaca tctgtccaac cagaaaagaa 3154
 tgtgtgtgtt tgagcagcat tgacacatat ctgctttgat aagagacttc ctgattctct 3214
 aggtcgggtc gtggttatcc cattgtggaa attcatcttg aatccattg tcctatagtc 3274
 ctagcaataa gagaaatttc ctcaagtttc catgtgcggg tctctagct gcagcaatac 3334
 tttgacattt aaagagaaat ttagagaata ttctcatcct ctaaaaatgt ttaaataat 3394
 accaaacagt ggccccctgc attagtttcc tgttgccact gcaaccatt acttggtagc 3454
 ttaaaaacaa cacattagct tatagtcctg gggatcagaa ttccaaaatg gatgtccctg 3514
 aatgaaaatc aagggtgtcag cagagctgtg ctcttctga aggtcttagg gagaagccgg 3574
 ttcttgcca tttcaagctt ctagaggctg gctgcattcc caggctccag tggctgggtca 3634
 agcttttctc acatggcatc actgtgacac tggccctccc acttccctct ttgacttaca 3694
 aagcccacca ggaagatcca ggataatctc tccatctaaa gatccttcat catcctggaa 3754
 gagccttttg ccatgcaaga caacatagcc acaggtgggg attaggacca ggacatcttt 3814
 ggggtgctgt tattctgcct accacacctt cctgccacbg actcccacag gagaggctac 3874
 aaaatgatct ggcgacagg gatgttttgt ttagcttgcg gactctaaca cttaaaaaaa 3934
 ccccatgca gaagatctgg ccatgctggg gctcacatc tcacctagca acaactggct 3994

ggagctgggc accagctctg cctttagaag ggggtgtccac ttcaccaggt caccacagcc 4054
cacactacgc cctatcactt cccacaatga ggctaagtgt ttgtttctac tgatcaatgc 4114
ccctgcaggt tgcatttatt gtaatgaaaa agaaagactg ggattaatct ctaatcaggt 4174
gagtagacca tgagaccaat gtgtgctcac attacccttt ttcttttttt tctttttctt 4234
tttctttttt tttttaatgt gagacaggat ctcatctctgt tgcctaggct ggagtgcagt 4294
ggcgcaatct cggctcactg caacctctgc ctccctgggt caagcaattc tcccacctca 4354
gcctcccaaa tagctgggat cactggcaca aaccaccatg cccagctaatt tttgtatttt 4414
ttgtagagac aggggtttcac catgttgccc aggtgtgtct caacctcctg ggctcaagca 4474
atcctcctgc ctccggcctcc caaagtgtct ggattacaga tgtgagccac cgcattccagc 4534
cccacaccct catttatacc aattacctgc ccagtaactg tggacttttg ctccctcacc 4594
cctgctctga tctggaagga gagggattat gttatagctt gtcagcacag tcccaagttc 4654
aatatttctg cggcaaaaac ttccttcaaa aaataaatgt acttcattgt attcaatgaa 4714
ttcaccttgg aaatgcaccg cctcaacttg ttcacatggc ataaatgaaa ggaattttat 4774
agtctcctaa atggcgtgta ctgcaagacc tcttgaacac tttccagagg ataggatatt 4834
taagtcatgc ccttggcgtt gcctatggca cctttccctt ctgaaagtct ggttcctgcc 4894
cagtgaccct tggccttgtg agccgagatg ctgaccctgc ataaagggcc aaaggagggc 4954
tgcggtctcc ttccctcact gaagagccct tatttgaatt cactgtgtgg agccctagcc 5014
ctccattctc gacattcccc aacctcccag ccccttccaa gcaggactag gtgccctgca 5074
ttccacccaa ggtgggattg gccttcctta ggctggctac ttgtcaccat caccgacatc 5134
actgttgctt gcaaggacac cacgtggcca ttttccttca actgagggct caaaactcct 5194
ggacaagttg ctggctcctg agaccagtat ttcctggagm tgtgcctcag tgaagggggc 5254
cagcctgagg aacctggct cttttcttta aagcccaggc cccacttaca taaaacattt 5314
cagggtcact ggaaacagtg aagtgccatt tgtngaagcc tactgnatgc cagccactg 5374
ctcatccacg tggatatgca tgcctacgag gaaggccagc gcatgcagga ntgggtctcta 5434
atgntgtggt cattgcacag aagggaagg tctcaaggaa gagtcaactg ggacaagcac 5494
aagcccaccg gacatggcct tggtaaagg ttagcagactg gtgtgtgtgg atctgcagt 5554
cttcactgga aataatttat tcattgcaga tacttttttag gtggcatttt attcatttcc 5614
tgtgctttaa ataaacaaat gtacaaaaaa acaagtatca agctgtttaa gtgcttcggc 5674
tacttgtccc ctgggttcagt agaggccccg gtttcccagt tgttgactgt gacaggctca 5734

gcacggggctc agcagatgct gtcttaattt gtggatgata cagaaagcca ggctttggga 5794
 tacaagttct ttcctcttca tttgatgccg tgcactgtgt gaagcagatg tttttgtccg 5854
 gaaataaaaa taatagtctt ggagtctcgc caaaaaaaaaa aag 5897

<210> 2
 <211> 749
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Leu Ser Ile Lys Ser Gly Glu Arg Ile Val Phe Thr Phe Ser Cys
 1 5 10 15
 Gln Ser Pro Glu Asn His Phe Val Ile Glu Ile Gln Lys Asn Ile Asp
 20 25 30
 Cys Met Ser Gly Pro Cys Pro Phe Gly Glu Val Gln Leu Gln Pro Ser
 35 40 45
 Thr Ser Leu Leu Pro Thr Leu Asn Arg Thr Phe Ile Trp Asp Val Lys
 50 55 60
 Ala His Lys Ser Ile Gly Leu Glu Leu Gln Phe Ser Ile Pro Arg Leu
 65 70 75 80
 Arg Gln Ile Gly Pro Gly Glu Ser Cys Pro Asp Gly Val Thr His Ser
 85 90 95
 Ile Ser Gly Arg Ile Asp Ala Thr Val Arg Ile Gly Thr Phe Cys
 100 105 110
 Ser Asn Gly Thr Val Ser Arg Ile Lys Met Gln Glu Gly Val Lys Met
 115 120 125
 Ala Leu His Leu Pro Trp Phe His Pro Arg Asn Val Ser Gly Phe Ser
 130 135 140
 Ile Ala Asn Arg Ser Ser Ile Lys Arg Leu Cys Ile Ile Glu Ser Val
 145 150 155 160
 Phe Glu Gly Glu Gly Ser Ala Thr Leu Met Ser Ala Asn Tyr Pro Glu
 165 170 175
 Gly Phe Pro Glu Asp Glu Leu Met Thr Trp Gln Phe Val Val Pro Ala
 180 185 190
 His Leu Arg Ala Ser Val Ser Phe Leu Asn Phe Asn Leu Ser Asn Cys
 195 200 205
 Glu Arg Lys Glu Glu Arg Val Glu Tyr Tyr Ile Pro Gly Ser Thr Thr
 210 215 220
 Asn Pro Glu Val Phe Lys Leu Glu Asp Lys Gln Pro Gly Asn Met Ala
 225 230 235 240

Gly Asn Phe Asn Leu Ser Leu Gln Gly Cys Asp Gln Asp Ala Gln Ser
 245 250 255
 Pro Gly Ile Leu Arg Leu Gln Phe Gln Val Leu Val Gln His Pro Gln
 260 265 270
 Asn Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Val Val Asp Leu Ser Asn Glu Arg Ala
 275 280 285
 Met Ser Leu Thr Ile Glu Pro Arg Pro Val Lys Gln Ser Arg Lys Phe
 290 295 300
 Val Pro Gly Cys Phe Val Cys Leu Glu Ser Arg Thr Cys Ser Ser Asn
 305 310 315 320
 Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Lys His Lys Ile Ser Phe Leu Cys Asp
 325 330 335
 Asp Leu Thr Arg Leu Trp Met Asn Val Glu Lys Thr Ile Ser Cys Thr
 340 345 350
 Asp His Arg Tyr Cys Gln Arg Lys Ser Tyr Ser Leu Gln Val Pro Ser
 355 360 365
 Asp Ile Leu His Leu Pro Val Glu Leu His Asp Phe Ser Trp Lys Leu
 370 375 380
 Leu Val Pro Lys Asp Arg Leu Ser Leu Val Leu Val Pro Ala Gln Lys
 385 390 395 400
 Leu Gln Gln His Thr His Glu Lys Pro Cys Asn Thr Ser Phe Ser Tyr
 405 410 415
 Leu Val Ala Ser Ala Ile Pro Ser Gln Asp Leu Tyr Phe Gly Ser Phe
 420 425 430
 Cys Pro Gly Gly Ser Ile Lys Gln Ile Gln Val Lys Gln Asn Ile Ser
 435 440 445
 Val Thr Leu Arg Thr Phe Ala Pro Ser Phe Gln Gln Glu Ala Ser Arg
 450 455 460
 Gln Gly Leu Thr Val Ser Phe Ile Pro Tyr Phe Lys Glu Glu Gly Val
 465 470 475 480
 Phe Thr Val Thr Pro Asp Thr Lys Ser Lys Val Tyr Leu Arg Thr Pro
 485 490 495
 Asn Trp Asp Arg Gly Leu Pro Ser Leu Thr Ser Val Ser Trp Asn Ile
 500 505 510
 Ser Val Pro Arg Asp Gln Val Ala Cys Leu Thr Phe Phe Lys Glu Arg
 515 520 525
 Ser Gly Val Val Cys Gln Thr Gly Arg Ala Phe Met Ile Ile Gln Glu
 530 535 540

Gln Arg Thr Arg Ala Glu Glu Ile Phe Ser Leu Asp Glu Asp Val Leu
 545 550 555 560
 Pro Lys Pro Ser Phe His His His Ser Phe Trp Val Asn Ile Ser Asn
 565 570 575
 Cys Ser Pro Thr Ser Gly Lys Gln Leu Asp Leu Leu Phe Ser Val Thr
 580 585 590
 Leu Thr Pro Arg Thr Val Asp Leu Thr Val Ile Leu Ile Ala Ala Val
 595 600 605
 Gly Gly Gly Val Leu Leu Leu Ser Ala Leu Gly Leu Ile Ile Cys Cys
 610 615 620
 Val Lys Lys Lys Lys Lys Lys Thr Asn Lys Gly Pro Ala Val Gly Ile
 625 630 635 640
 Tyr Asn Gly Asn Ile Asn Thr Glu Met Pro Gly Ser Gln Lys Ser Phe
 645 650 655
 Arg Lys Gly Glu Arg Thr Met Thr Pro Met Cys Met Gln Ser Ser Arg
 660 665 670
 Thr Pro Trp Tyr Met Gly Ile Cys Tyr Arg Ile Pro Ala Ala Pro Ser
 675 680 685
 Cys Ser Gln Arg Trp Thr Pro Thr Gly Arg Ser Arg Ala Pro Trp Gly
 690 695 700
 Ser Val Leu Pro Pro His Pro Pro Tyr Ala Pro Gly Pro Gln Leu Gln
 705 710 715 720
 Ser Trp Pro Leu Arg Ser His Leu Leu Ala Pro Leu Leu Ser Leu Arg
 725 730 735
 Val Asn Arg Thr Pro Ser Pro Ile Pro Thr Met Gly Met
 740 745

<210> 3
 <211> 6163
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(282)

<220>
 <221> GC_signal
 <222> (147)..(157)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (201)..(209)
 <223> cap signal; Transkriptionsstart

```
<220>
<221> 3'UTR
<222> (2794)..(6163)
```

```
<220>
<221> 3'UTR
<222> (2794)..(6163)
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (283) .. (2793)
```

```

<400> 3
ccaacgccgc aatggggagt agtagggacc cagcaacccg gtgccgggag ccctgcaccc 60
tgaggagggag aggcgggtcgc tgaggcagga agaggaggag gagagagagg agggacgcac 120
cgggtcagct cgcgatactg ctgcgcaggg cggggctcgg gccgggtccgc ccgcgcgcag 180
gtgagtgagc cagggcggag cgcagctgcg ccgggcttgg gcgcctgggg ccgcgcgtcc 240
ccaccgtcgt tttccccacc gaggccgagg cgtcccggag tc atg gcc ggc ctg      294
                                     Met Ala Gly Leu
                                     1

```

aac tgc ggg gtc tct atc gca ctg cta ggg gtt ctg ctg ctg ggt gcg 342
Asn Cys Gly Val Ser Ile Ala Leu Leu Gly Val Leu Leu Leu Gly Ala
5 10 15 20

gcg cgc ctg ccg cgc ggg gca gaa gct ttt gag att gct ctg cca cga 390
Ala Arg Leu Pro Arg Gly Ala Glu Ala Phe Glu Ile Ala Leu Pro Arg
25 30 35

gaa agc aac att aca gtt ctc ata aag ctg ggg acg ccg act ctg ctg 438
Glu Ser Asn Ile Thr Val Leu Ile Lys Leu Gly Thr Pro Thr Leu Leu
40 45 50

gca aaa ccc tgt tac atc gtc att tct aaa aga cat ata acc atg ttg 486
Ala Lys Pro Cys Tyr Ile Val Ile Ser Lys Arg His Ile Thr Met Leu
55 60 65

tcc atc aag tct gga gaa aga ata gtc ttt acc ttt agc tgc cag agt 534
Ser Ile Lys Ser Gly Glu Arg Ile Val Phe Thr Phe Ser Cys Gln Ser
70 75 80

cct gag aat cac ttt gtc ata gag atc cag aaa aat att gac tgt atg 582
Pro Glu Asn His Phe Val Ile Glu Ile Gln Lys Asn Ile Asp Cys Met
85 90 95 100

tca ggc cca tgt cct ttt ggg gag gtt cag ctt cag ccc tcg aca tcg 630
Ser Gly Pro Cys Pro Phe Gly Glu Val Gln Leu Gln Pro Ser Thr Ser
105 110 115

ttg	ttg	cct	acc	ctc	aac	aga	act	ttc	atc	tgg	gat	gtc	aaa	gct	cat	678
Leu	Leu	Pro	Thr	Leu	Asn	Arg	Thr	Phe	Ile	Trp	Asp	Val	Lys	Ala	His	
			120					125					130			

aag agc atc ggt tta gag ctg cag ttt tcc atc cct cgc ctg agg cag Lys Ser Ile Gly Leu Glu Leu Gln Phe Ser Ile Pro Arg Leu Arg Gln 135 140 145	726
atc ggt ccg ggt gag agc tgc cca gac gga gtc act cac tcc atc agc Ile Gly Pro Gly Glu Ser Cys Pro Asp Gly Val Thr His Ser Ile Ser 150 155 160	774
ggc cga atc gat gcc acc gtg gtc agg atc gga acc ttc tgc agc aat Gly Arg Ile Asp Ala Thr Val Val Arg Ile Gly Thr Phe Cys Ser Asn 165 170 175 180	822
ggc act gtg tcc cgg atc aag atg caa gaa gga gtg aaa atg gcc tta Gly Thr Val Ser Arg Ile Lys Met Gln Glu Gly Val Lys Met Ala Leu 185 190 195	870
cac ctc cca tgg ttc cac ccc aga aat gtc tcc ggc ttc agc att gca His Leu Pro Trp Phe His Pro Arg Asn Val Ser Gly Phe Ser Ile Ala 200 205 210	918
aac cgc tca tct ata aaa cgt ctg tgc atc atc gag tct gtg ttt gag Asn Arg Ser Ser Ile Lys Arg Leu Cys Ile Ile Glu Ser Val Phe Glu 215 220 225	966
ggt gaa ggc tca gca acc ctg atg tct gcc aac tac cca gaa ggc ttc Gly Glu Gly Ser Ala Thr Leu Met Ser Ala Asn Tyr Pro Glu Gly Phe 230 235 240	1014
cct gag gat gag ctc atg acg tgg cag ttt gtc gtt cct gca cac ctg Pro Glu Asp Glu Leu Met Thr Trp Gln Phe Val Val Pro Ala His Leu 245 250 255 260	1062
cgg gcc agc gtc tcc ttc ctc aac ttc aac ctc tcc aac tgt gag agg Arg Ala Ser Val Ser Phe Leu Asn Phe Asn Leu Ser Asn Cys Glu Arg 265 270 275	1110
aag gag gag cgg gtt gaa tac tac atc ccg ggc toc acc acc aac ccc Lys Glu Glu Arg Val Glu Tyr Tyr Ile Pro Gly Ser Thr Thr Asn Pro 280 285 290	1158
gag gtg ttc aag ctg gag gac aag cag cct ggg aac atg gcg ggg aac Glu Val Phe Lys Leu Glu Asp Lys Gln Pro Gly Asn Met Ala Gly Asn 295 300 305	1206
ttc aac ctc tct ctg caa ggc tgt gac caa gat gcc caa agt cca ggg Phe Asn Leu Ser Leu Gln Gly Cys Asp Gln Asp Ala Gln Ser Pro Gly 310 315 320	1254
atc ctc cgg ctg cag ttc caa gtt ttg gtc caa cat cca caa aat gaa Ile Leu Arg Leu Gln Phe Gln Val Leu Val Gln His Pro Gln Asn Glu 325 330 335 340	1302
agc aat aaa atc tac gtg gtt gac ttg agt aat gag cga gcc atg tca Ser Asn Lys Ile Tyr Val Val Asp Leu Ser Asn Glu Arg Ala Met Ser 345 350 355	1350

ctc acc atc gag cca cgg ccc gtc aaa cag agc cgc aag ttt gtc cct	1398
Leu Thr Ile Glu Pro Arg Pro Val Lys Gln Ser Arg Lys Phe Val Pro	
360 365 370	
ggc tgt ttc gtg tgt cta gaa tct cgg acc tgc agt agc aac ctc acc	1446
Gly Cys Phe Val Cys Leu Glu Ser Arg Thr Cys Ser Ser Asn Leu Thr	
375 380 385	
ctg aca tct ggc tcc aaa cac aaa atc tcc ttc ctt tgt gat gat ctg	1494
Leu Thr Ser Gly Ser Lys His Lys Ile Ser Phe Leu Cys Asp Asp Leu	
390 395 400	
aca cgt ctg tgg atg aat gtg gaa aaa acc ata agc tgc aca gac cac	1542
Thr Arg Leu Trp Met Asn Val Glu Lys Thr Ile Ser Cys Thr Asp His	
405 410 415 420	
cgg tac tgc caa agg aaa tcc tac tca ctc cag gtg ccc agt gac atc	1590
Arg Tyr Cys Gln Arg Lys Ser Tyr Ser Leu Gln Val Pro Ser Asp Ile	
425 430 435	
ctc cac ctg cct gtg gag ctg cat gac ttc tcc tgg aag ctg ctg gtg	1638
Leu His Leu Pro Val Glu Leu His Asp Phe Ser Trp Lys Leu Leu Val	
440 445 450	
ccc aag gac agg ctc agc ctg gtg ctg gtg cca gcc cag aag ctg cag	1686
Pro Lys Asp Arg Leu Ser Leu Val Leu Val Pro Ala Gln Lys Leu Gln	
455 460 465	
cag cat aca cac gag aag ccc tgc aac acc agc ttc agc tac ctc gtg	1734
Gln His Thr His Glu Lys Pro Cys Asn Thr Ser Phe Ser Tyr Leu Val	
470 475 480	
gcc agt gcc ata ccc agc cag gac ctg tac ttc ggc tcc ttc tgc ccg	1782
Ala Ser Ala Ile Pro Ser Gln Asp Leu Tyr Phe Gly Ser Phe Cys Pro	
485 490 495 500	
gga ggc tct atc aag cag atc cag gtg aag cag aac atc tcg gtg acc	1830
Gly Gly Ser Ile Lys Gln Ile Gln Val Lys Gln Asn Ile Ser Val Thr	
505 510 515	
ctt cgc acc ttt gcc ccc agc ttc caa caa gag gcc tcc agg cag ggt	1878
Leu Arg Thr Phe Ala Pro Ser Phe Gln Gln Glu Ala Ser Arg Gln Gly	
520 525 530	
ctg acg gtg tcc ttt ata cct tat ttc aaa gag gaa ggc gtt ttc acg	1926
Leu Thr Val Ser Phe Ile Pro Tyr Phe Lys Glu Glu Gly Val Phe Thr	
535 540 545	
gtg acc cct gac aca aaa agc aag gtc tac ctg agg acc ccc aac tgg	1974
Val Thr Pro Asp Thr Lys Ser Lys Val Tyr Leu Arg Thr Pro Asn Trp	
550 555 560	
gac cgg ggc ctg cca tcc ctc acc tct gtg tcc tgg aac atc agc gtg	2022
Asp Arg Gly Leu Pro Ser Leu Thr Ser Val Ser Trp Asn Ile Ser Val	
565 570 575 580	

ccc aga gac cag gtg gcc tgc ctg act ttc ttt aag gag cgg agc ggc 2070
 Pro Arg Asp Gln Val Ala Cys Leu Thr Phe Phe Lys Glu Arg Ser Gly
 585 590 595

gtg gtc tgc cag aca ggg cgc gca ttc atg atc atc cag gag cag cgg 2118
 Val Val Cys Gln Thr Gly Arg Ala Phe Met Ile Ile Gln Glu Gln Arg
 600 605 610

acc cgg gct gag gag atc ttc agc ctg gac gag gat gtg ctc ccc aag 2166
 Thr Arg Ala Glu Glu Ile Phe Ser Leu Asp Glu Asp Val Leu Pro Lys
 615 620 625

cca agc ttc cac cat cac agc ttc tgg gtc aac atc tct aac tgc agc 2214
 Pro Ser Phe His His His Ser Phe Trp Val Asn Ile Ser Asn Cys Ser
 630 635 640

ccc acg agc ggc aag cag cta gac ctg ctc ttc tgc gtg aca ctt acc 2262
 Pro Thr Ser Gly Lys Gln Leu Asp Leu Leu Phe Ser Val Thr Leu Thr
 645 650 655 660

cca agg act gtg gac ttg act gtc atc ctc atc gca gcg gtg gga ggt 2310
 Pro Arg Thr Val Asp Leu Thr Val Ile Leu Ile Ala Ala Val Gly Gly
 665 670 675

gga gtc tta ctg ctg tct gcc ctc ggg ctc atc att tgc tgt gtg aaa 2358
 Gly Val Leu Leu Leu Ser Ala Leu Gly Leu Ile Ile Cys Cys Val Lys
 680 685 690

aag aag aaa aag aag aca aac aag ggc ccc gct gtg ggt atc tac aat 2406
 Lys Lys Lys Lys Lys Thr Asn Lys Gly Pro Ala Val Gly Ile Tyr Asn
 695 700 705

ggc aac atc aat act gag atg ccg agg cag cca aaa aag ttt cag aaa 2454
 Gly Asn Ile Asn Thr Glu Met Pro Arg Gln Pro Lys Lys Phe Gln Lys
 710 715 720

ggg cga aag gac aat gac tcc cat gtg tat gca gtc atc gag gac acc 2502
 Gly Arg Lys Asp Asn Asp Ser His Val Tyr Ala Val Ile Glu Asp Thr
 725 730 735 740

atg gta tat ggg cat ctg cta cag gat tcc agc ggc tcc ttc ctg cag 2550
 Met Val Tyr Gly His Leu Leu Gln Asp Ser Ser Gly Ser Phe Leu Gln
 745 750 755

cca gag gtg gac acc tac cgg ccg ttc cag ggc acc atg ggg gtc tgt 2598
 Pro Glu Val Asp Thr Tyr Arg Pro Phe Gln Gly Thr Met Gly Val Cys
 760 765 770

cct ccc tcc cca ccc acc ata tgc tcc agg gcc cca act gca aag ttg 2646
 Pro Pro Ser Pro Pro Thr Ile Cys Ser Arg Ala Pro Thr Ala Lys Leu
 775 780 785

gcc act gag gag cca cct cct cgc tcc cct cct gag tct gag agt gaa 2694
 Ala Thr Glu Glu Pro Pro Pro Arg Ser Pro Pro Glu Ser Glu Ser Glu
 790 795 800

ccg tac acc ttc tcc cat ccc aac aat ggg gat gta agc agc aag gac 2742
 Pro Tyr Thr Phe Ser His Pro Asn Asn Gly Asp Val Ser Ser Lys Asp
 805 810 815 820

aca gac att ccc tta ctg aac act cag gag ccc atg gag cca gca gaa 2790
 Thr Asp Ile Pro Leu Leu Asn Thr Gln Glu Pro Met Glu Pro Ala Glu
 825 830 835

taa cttgatccat tccagacgct ttgctgagtt tcataaagca gggcactgag 2843

acacccgtcc gtgttcctaa ccagaaatcc taaagaagag gaattataca gaaggaacag 2903
 caggagggttt tcctggacac cgccaacttc acattgctca gtggactcat tctaagggca 2963
 agacattgaa aatgatgaat tccaatctgg atacagtcac gacagctcat gtgctcctca 3023
 acttaggctg tgcggttagc cagcctgtaa tgagaggaga gaggcctgag tcacctagca 3083
 tagggttgca gcaagccctg gattcagagt gttaaacaga ggcttgccct cttcaggaca 3143
 acagttccaa ttccaaggag cctacctgag gtccctactc tcactggggt cccaggatg 3203
 aaaacgacaa tgtgcctttt tattattatt tatttggtgg tcctgtgtta tttaagagat 3263
 caaatgtata accacctagc tcttttcacc tgacttagta ataactcata ctaactgggt 3323
 tggatgctg ggttgtagt tctactgacc gctagataaa cgtgtgctg tccccagggt 3383
 ggtgggaata atttacaatc tgtccaacca gaaaagaatg tgtgtgtttg agcagcattg 3443
 acacatatct gctttgataa gagacttcct gattctctag gtgggttcgt gggtatccca 3503
 ttgtggaaat tcatcttgaa tccattgtc ctatagtcct agcaataaga gaaatttcct 3563
 caagtttcca tgtgcggttc tcctagctgc agcaatactt tgacatttaa agagaaattt 3623
 agagaatatt ctcatcctct aaaaatgttt aaatatatac caaacagtgg cccctgcat 3683
 tagttttctg ttgccactgc aaccattac ttggtagctt aaaaacaaca cattagctta 3743
 tagtcctggg gatcagaatt ccaaaatgga tgtccctgaa tgaaaatcaa ggtgtcagca 3803
 gagctgtgct ccttctgaag gctctaggga gaagccgggt ccttgccatt tcaagcttct 3863
 agaggctggc tgcattccca ggctccagtg gctgggtcaag cttttctcac atggcatcac 3923
 tgtgacactg gccctccac ttccctcttt gacttacaaa gccaccagg aagatccagg 3983
 ataatctctc catctaaaga tccttcatca tcctggaaga gccttttgcc atgcaagaca 4043
 acatagccac aggtggggat taggaccagg acatctttgg ggtgctgtta ttctgcctac 4103
 cacaccttc tgccactgac tcccacagga gaggctacaa aatgatctgg cgcacagga 4163
 tgttttggtt agcttgcgga ctctaact taaaaaacc ccagatcaga agatctggcc 4223
 atgctggggc tcacattctc acctagcaac aactggctgg agctgggcac cagctctgcc 4283

tttagaaggg gtgtccactt caccagggtca ccacagccca cactacgccc tatcacttcc 4343
cacaatgagg ctaagtgttt gtttctactg atcaatgccc ctgcagggtg catttattgt 4403
aatgaaaaag aaagactggg attaatctct aatcagggtga gtagaccatg agaccaatgt 4463
gtgctcacat tacccttttt cttttttttt tttttctttt tctttttttt tttaatgtga 4523
gacaggatct cattctgttg cctaggctgg agtgcaagtgg cgcaatctcg gctcactgca 4583
acctctgcct cctgggctca agcaattctc ccacctcagc ctcccaaata gctgggatca 4643
ctggcacaaa ccaccatgcc cagctaattt tgtatttttt gtagagacag ggtttcacca 4703
tgttgcccag gctgggtctca acctcctggg ctcaagcaat cctcctgcct cggcctccca 4763
aagtgtctggg attacagatg tgagccaccg catccagccc cacacctca tttataccaa 4823
ttacctgccc agtaactgtg gacttttgct tcctcaccct tgctctgacg tggaaggaga 4883
gggattatgt tatagcttgt cagcacagtc ccaagttcaa tatttctgcg gcaaaaactt 4943
ccttcaaaaa ataatgtac ttcattgtat tcaatgaatt caccttgga atgcaccgcc 5003
tcaacttggt cacatggcat aaatgaaagg aattttatag tctcctaaat ggcgtgtact 5063
gcaagacctc ttgaacactt tccagaggat aggatattta agtcatgccc ttggcgttgc 5123
ctatggcacc tttcccttct gaaagtctgg ttcctgcccc gtgacccttg gccttgtgag 5183
ccgagatgct gacctgcat aaagggccaa aggagggtg cggttctctt ccctcactga 5243
agagccctta tttgaattca ctgtgtggag ccctagccct ccattctcga cattcccaa 5303
cctcccagcc cttccaagc aggactaggt gccctgcatt ccaccaagg tgggattggc 5363
cttccttagg ctggctactt gtcaccatca ccgacatcac tgttgcctgc aaggacacca 5423
cgtggccatt ttccttcaac tgagggtcga aaactcctgg acaagttgct ggctcctgag 5483
accagtattt cctggagctg tgcctcagtg aaggggcccc gcctgaggaa ccctggctct 5543
tttctttaa gcccaggccc cacttacata aaacatttca gggtcactgg aaacagtga 5603
gtgccatttg ttgaagccta ctgcatgcca gccactgct catccacgtg gtctgccatg 5663
cctacgagga aggccagcgc atgcaggact ggtctcta at gctgtggtca ttgcacagaa 5723
gggaaaggtc tcaaggaaga gtcaactggg acaagcaca gccaccgga catggccttg 5783
gtaaagggtta gcagactggt gtgtgtggat ctgcagtgt tctactggaaa taatttatc 5843
attgcagata ctttttaggt ggcattttat tcatctctg tgctttaaat aaacaaatgt 5903
acaaaaaac aagtatcaag ctgtttaagt gcttcggcta cttgtccct ggttcagtag 5963
aggccccggt tccccagttg ttgactgtga caggctcagc atgggctcag cagatgtgt 6023

cttaatttgt ggatgataca gaaagccagg ctttgggata caagttcttt cctcttcatt 6083
 tgatgccgtg cactgtgtga agcagatgtt tttgtccgga aataaaaata atagtcttgg 6143
 agtctcgcca aaaaaaaaaa 6163

<210> 4
 <211> 836
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Ala Gly Leu Asn Cys Gly Val Ser Ile Ala Leu Leu Gly Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Gly Ala Ala Arg Leu Pro Arg Gly Ala Glu Ala Phe Glu Ile
 20 25 30
 Ala Leu Pro Arg Glu Ser Asn Ile Thr Val Leu Ile Lys Leu Gly Thr
 35 40 45
 Pro Thr Leu Leu Ala Lys Pro Cys Tyr Ile Val Ile Ser Lys Arg His
 50 55 60
 Ile Thr Met Leu Ser Ile Lys Ser Gly Glu Arg Ile Val Phe Thr Phe
 65 70 75 80
 Ser Cys Gln Ser Pro Glu Asn His Phe Val Ile Glu Ile Gln Lys Asn
 85 90 95
 Ile Asp Cys Met Ser Gly Pro Cys Pro Phe Gly Glu Val Gln Leu Gln
 100 105 110
 Pro Ser Thr Ser Leu Leu Pro Thr Leu Asn Arg Thr Phe Ile Trp Asp
 115 120 125
 Val Lys Ala His Lys Ser Ile Gly Leu Glu Leu Gln Phe Ser Ile Pro
 130 135 140
 Arg Leu Arg Gln Ile Gly Pro Gly Glu Ser Cys Pro Asp Gly Val Thr
 145 150 155 160
 His Ser Ile Ser Gly Arg Ile Asp Ala Thr Val Val Arg Ile Gly Thr
 165 170 175
 Phe Cys Ser Asn Gly Thr Val Ser Arg Ile Lys Met Gln Glu Gly Val
 180 185 190
 Lys Met Ala Leu His Leu Pro Trp Phe His Pro Arg Asn Val Ser Gly
 195 200 205
 Phe Ser Ile Ala Asn Arg Ser Ser Ile Lys Arg Leu Cys Ile Ile Glu
 210 215 220

Ser Val Phe Glu Gly Glu Gly Ser Ala Thr Leu Met Ser Ala Asn Tyr
 225 230 235 240
 Pro Glu Gly Phe Pro Glu Asp Glu Leu Met Thr Trp Gln Phe Val Val
 245 250 255
 Pro Ala His Leu Arg Ala Ser Val Ser Phe Leu Asn Phe Asn Leu Ser
 260 265 270
 Asn Cys Glu Arg Lys Glu Glu Arg Val Glu Tyr Tyr Ile Pro Gly Ser
 275 280 285
 Thr Thr Asn Pro Glu Val Phe Lys Leu Glu Asp Lys Gln Pro Gly Asn
 290 295 300
 Met Ala Gly Asn Phe Asn Leu Ser Leu Gln Gly Cys Asp Gln Asp Ala
 305 310 315 320
 Gln Ser Pro Gly Ile Leu Arg Leu Gln Phe Gln Val Leu Val Gln His
 325 330 335
 Pro Gln Asn Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Val Val Asp Leu Ser Asn Glu
 340 345 350
 Arg Ala Met Ser Leu Thr Ile Glu Pro Arg Pro Val Lys Gln Ser Arg
 355 360 365
 Lys Phe Val Pro Gly Cys Phe Val Cys Leu Glu Ser Arg Thr Cys Ser
 370 375 380
 Ser Asn Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Lys His Lys Ile Ser Phe Leu
 385 390 395 400
 Cys Asp Asp Leu Thr Arg Leu Trp Met Asn Val Glu Lys Thr Ile Ser
 405 410 415
 Cys Thr Asp His Arg Tyr Cys Gln Arg Lys Ser Tyr Ser Leu Gln Val
 420 425 430
 Pro Ser Asp Ile Leu His Leu Pro Val Glu Leu His Asp Phe Ser Trp
 435 440 445
 Lys Leu Leu Val Pro Lys Asp Arg Leu Ser Leu Val Leu Val Pro Ala
 450 455 460
 Gln Lys Leu Gln Gln His Thr His Glu Lys Pro Cys Asn Thr Ser Phe
 465 470 475 480
 Ser Tyr Leu Val Ala Ser Ala Ile Pro Ser Gln Asp Leu Tyr Phe Gly
 485 490 495
 Ser Phe Cys Pro Gly Gly Ser Ile Lys Gln Ile Gln Val Lys Gln Asn
 500 505 510
 Ile Ser Val Thr Leu Arg Thr Phe Ala Pro Ser Phe Gln Gln Glu Ala
 515 520 525

Ser Arg Gln Gly Leu Thr Val Ser Phe Ile Pro Tyr Phe Lys Glu Glu
 530 535 540
 Gly Val Phe Thr Val Thr Pro Asp Thr Lys Ser Lys Val Tyr Leu Arg
 545 550 555 560
 Thr Pro Asn Trp Asp Arg Gly Leu Pro Ser Leu Thr Ser Val Ser Trp
 565 570 575
 Asn Ile Ser Val Pro Arg Asp Gln Val Ala Cys Leu Thr Phe Phe Lys
 580 585 590
 Glu Arg Ser Gly Val Val Cys Gln Thr Gly Arg Ala Phe Met Ile Ile
 595 600 605
 Gln Glu Gln Arg Thr Arg Ala Glu Glu Ile Phe Ser Leu Asp Glu Asp
 610 615 620
 Val Leu Pro Lys Pro Ser Phe His His His Ser Phe Trp Val Asn Ile
 625 630 635 640
 Ser Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gly Lys Gln Leu Asp Leu Leu Phe Ser
 645 650 655
 Val Thr Leu Thr Pro Arg Thr Val Asp Leu Thr Val Ile Leu Ile Ala
 660 665 670
 Ala Val Gly Gly Gly Val Leu Leu Leu Ser Ala Leu Gly Leu Ile Ile
 675 680 685
 Cys Cys Val Lys Lys Lys Lys Lys Lys Thr Asn Lys Gly Pro Ala Val
 690 695 700
 Gly Ile Tyr Asn Gly Asn Ile Asn Thr Glu Met Pro Arg Gln Pro Lys
 705 710 715 720
 Lys Phe Gln Lys Gly Arg Lys Asp Asn Asp Ser His Val Tyr Ala Val
 725 730 735
 Ile Glu Asp Thr Met Val Tyr Gly His Leu Leu Gln Asp Ser Ser Gly
 740 745 750
 Ser Phe Leu Gln Pro Glu Val Asp Thr Tyr Arg Pro Phe Gln Gly Thr
 755 760 765
 Met Gly Val Cys Pro Pro Ser Pro Pro Thr Ile Cys Ser Arg Ala Pro
 770 775 780
 Thr Ala Lys Leu Ala Thr Glu Glu Pro Pro Pro Arg Ser Pro Pro Glu
 785 790 795 800
 Ser Glu Ser Glu Pro Tyr Thr Phe Ser His Pro Asn Asn Gly Asp Val
 805 810 815
 Ser Ser Lys Asp Thr Asp Ile Pro Leu Leu Asn Thr Gln Glu Pro Met
 820 825 830

Glu Pro Ala Glu
835

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 5
accgcctcaa cttgttcaca tgg

23

<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 6
ctgggtctcag gagccagcaa cttgtc

26

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 7
ctcatgacgt ggcagtttgt cgttc

25

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 8
ggctcgctca ttactcaagt caacca

26

<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 9
attcgcgact gatgatcgat tttttttttt tttttt 36

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 10
attcgcgact gatgatcgat 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 11
gagatattag aattctactc 20

<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 12
gagtagaatt ctaatat 17

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 13

agtccatgtg aacaagttga gg

22

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 14

aattctccca cctcagcctc

20

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 15

aggatgaaaa cgacaatgtg cc

22

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 16

agaattgctt gagcccagga g

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 17

caacttcaca ttgctcagtg g

21

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 18
tgagcaagtt cagcctgggt aagtc 25

<210> 19
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 19
caccgaatac tcataaagaa ggtccc 26

<210> 20
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 20
tagacttcga gcaggagatg gccact 26

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 21
ccagccatgt acgtagccat 20

<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 22

ccaagaagga aggctggaa

19

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 23

ccatcaccat cttccaggag cgaga

25

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 24

ccaagaagga aggctggaa

19

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 25

tgcaggaggc attgctgatg

20

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 26

aaatcgtgca cttgcaggc

19

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 27
ttgatgcggtt ccagctga 18

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 28
ttgaattcac tgtgtggagc c 21

<210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 29
tgcaggcaac agtgatgtc 19

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 30
attggccttc cttaggctgg ctac 24

<210> 31
<211> 43
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 31

tgtagcgtga agacgacaga aagggcgtgg taccgagctc gag

43

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 32

agggcgtggt accgagctcg ag

22

<210> 33

<211> 11

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 33

ggctcgagct c

11

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 34

ggccatgtcc ggtgggcttg tg

22

<210> 35

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 35

ctcaaaactc ctggacaagt tgctgg

26

26

<210> 36
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 36

aaggtgaagg tcggagtcaa cg

22

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 37

ggcagagatg atgacccttt tggc

24

<210> 38
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(282)

<220>

<221> GC_signal

<222> (147)..(157)

<220>

<221> misc_feature

<222> (201)..(209)

<223> cap signal; Transkriptionsstart

<220>

<221> 3'UTR

<222> (2794)..(6163)

<220>

<221> 3'UTR

<222> (2794)..(6163)

<220>

<221> CDS

<222> (283)..(2793)

<400> 38

agcagcagaa cccctagcag tgc

23

<210> 39

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 39

agaaccacctta gcagtgcgat agagac

26

<210> 40

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 40

gaactgtaat gttgctttct cgtggca

27

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH, MEDLINE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! NCBI; Ac: AW063026, ZHOU Y. ET AL.: "EST392 human ovarian cancer cDNA homo sapiens cDNA clone EST392, mRNA sequence" XP002177291 abstract --- -/--	1-9



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 September 2001

Date of mailing of the international search report

28/09/2001

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Novak, S

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>TAKEUCHI T ET AL: "Reverse biochemistry: Use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 96, 28 September 1999 (1999-09-28), pages 11054-11061, XP002139964 ISSN: 0027-8424 abstract; figures 3,4</p>	1-9
Y	<p>WO 00 09691 A (SAFFRAN DOUGLAS C ;AFAR DANIEL E (US); HUBERT RENE S (US); LEONG K) 24 February 2000 (2000-02-24) the whole document</p>	1-9
A	<p>GERSTEIN MARK ET AL: "The current excitement in bioinformatics: Analysis of whole-genome expression data: How does it relate to protein structure and function?" CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY, vol. 10, no. 5, October 2000 (2000-10), pages 574-584, XP002177290 ISSN: 0959-440X</p>	
P,X	<p>DE 199 09 503 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT) 7 September 2000 (2000-09-07) the whole document</p>	1-9
P,X	<p>DATABASE SWALL 'Online! NCBI; Ac: Q9H5V8, 1 March 2001 (2001-03-01) WATANABE K. ET AL.: "NEDO human cDNA sequencing project" XP002177292 abstract</p>	1-9

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0009691 A	24-02-2000	AU 5556199 A EP 1104462 A US 6277972 B	06-03-2000 06-06-2001 21-08-2001
DE 19909503 A	07-09-2000	AU 3283500 A WO 0052157 A	21-09-2000 08-09-2000

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C07K14/47

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

 Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH, MEDLINE, EMBL

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! NCBI; Ac: AW063026, ZHOU Y. ET AL.: "EST392 human ovarian cancer cDNA homo sapiens cDNA clone EST392, mRNA sequence" XP002177291 Zusammenfassung --- -/---	1-9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. September 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/09/2001

 Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Novak, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>TAKEUCHI T ET AL: "Reverse biochemistry: Use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 96, 28. September 1999 (1999-09-28), Seiten 11054-11061, XP002139964 ISSN: 0027-8424 Zusammenfassung; Abbildungen 3,4</p>	1-9
Y	<p>WO 00 09691 A (SAFFRAN DOUGLAS C ;AFAR DANIEL E (US); HUBERT RENE S (US); LEONG K) 24. Februar 2000 (2000-02-24) das ganze Dokument</p>	1-9
A	<p>GERSTEIN MARK ET AL: "The current excitement in bioinformatics: Analysis of whole-genome expression data: How does it relate to protein structure and function?"</p> <p>CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY, Bd. 10, Nr. 5, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 574-584, XP002177290 ISSN: 0959-440X</p>	
P,X	<p>DE 199 09 503 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT) 7. September 2000 (2000-09-07) das ganze Dokument</p>	1-9
P,X	<p>DATABASE SWALL 'Online!' NCBI; Ac: Q9H5V8, 1. März 2001 (2001-03-01) WATANABE K. ET AL.: "NEDO human cDNA sequencing project" XP002177292 Zusammenfassung</p>	1-9

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0009691 A	24-02-2000	AU 5556199 A	06-03-2000
		EP 1104462 A	06-06-2001
		US 6277972 B	21-08-2001
DE 19909503 A	07-09-2000	AU 3283500 A	21-09-2000
		WO 0052157 A	08-09-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)